

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



INDUCCIÓN DE PRODUCTOS
BIOACTIVOS EN LA MICROALGA MARINA
Tetraselmis suecica.

Memoria presentada por:

D^a. Ruth Gabriela Ulloa Mercado

*para optar al grado de Doctora por la
Universidad de Santiago de Compostela*

Santiago de Compostela, 2011

Título: INDUCCIÓN DE PRODUCTOS BIOACTIVOS DE LA
MICROALGA MARINA *Tetraselmis suecica*

Realizada por: Ruth Gabriela Ulloa Mercado

Dirigida por: M^a José Núñez García y Jaime Fábregas Casal

Programa de Doctorado de Ingeniería Química y Ambiental
Departamento de Ingeniería Química
Universidad de Santiago de Compostela
Santiago de Compostela, 2011

Dña. M^a José Núñez García, Catedrática de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela, y **D. Jaime Fábregas Casal**, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMAN:

Que la memoria titulada “**INDUCCIÓN DE PRODUCTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE LA MICROALGA MARINA *Tetraselmis suecica***”, que para optar al grado de Doctora en Ingeniería Química, Programa de Doctorado en Ingeniería Química y ambiental, presenta **D^a. Ruth Gabriela Ulloa Mercado** y que cumple con todos los requisitos necesarios para ser presentada como Tesis doctoral ha sido realizada bajo nuestra inmediata dirección en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en Santiago de Compostela, a 5 de Diciembre de 2011.

M^a José Núñez García

Jaime Fábregas Casal

Ruth Gabriela Ulloa Mercado

Agradecimientos

Han sido muchas personas las que de una u otra forma me han apoyado en este camino, las que están lejos pero que están en mi corazón y las que están cerca y llenan mi vida día a día.

A mis directores de tesis María José Núñez y Jaime Fábregas por orientarme y poner a mi disposición todo lo necesario para el desarrollo de este trabajo, su experiencia, sabiduría, orientación y sus consejos.

A Ana Otero que me brindó su ayuda y experiencia. Reconozco su gran vocación, el amor a su trabajo y su entusiasmo para que las cosas se hagan bien. Sus lecciones me ayudaron en mi aprendizaje y crecimiento.

A mis buenos amigos de laboratorio de la ETSE: María Jeréz, Rita Alves, Carole y especialmente a Fran (que sin tu ayuda no lo hubiera logrado en este tiempo), que me brindaron sus conocimientos y lo más importante...su amistad y que los voy a extrañar muchísimo. A Helena Gil... por acompañarme en este tiempo, sobre todo al quedarme sola en Santiago y Ángela Cortina de Microbiología...voy a extrañarlas mucho. A la familia Sineiro Sánchez: Marivel, Jorge y Sarita que adoptaron a mi familia como su familia y que compartimos tantos momentos agradables, aparte del trabajo... A todos Ustedes los espero en México cuando quieran.

A mis amigas las mexicanas en Santiago: Angélica, Carmen y Denisse, sin su apoyo hubiera sido más difícil mantenerme aquí. He aprendido mucho de la vida con Ustedes. Y mis paisanos que se integraron después y tuve la oportunidad de conocerlos: Xitlalli y Ulises..

A mi familia, mamá, papá, mis hermanos Ismael, Rodrigo, Pepe y Amanda, 12 sobrinos, cuñadas y cuñado que desde el otro lado del Atlántico me dan ánimos de seguir adelante. También desde allá a mis amig@s Edna, Ana María, Olivia, Adolfo, Luciano y Totonó que siempre estuvieron pendientes de mí en la distancia y me ayudaron cuando necesitaba... Gracias.

Y finalmente, a mis amores: Miguel y Gabriela, gracias por aceptar afrontar y vivir conmigo este proyecto incondicionalmente... hasta el final.

¡Muchas Gracias!

A mis amores: Gabriela y Miguel.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

| | |
|---|------|
| 1.1 LAS MICROALGAS Y SUS APLICACIONES | 1-1 |
| 1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES | 1-1 |
| 1.1.2 COMPOSICIÓN | 1-3 |
| 1.1.3 APLICACIONES | 1-4 |
| 1.2 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LAS MICROALGAS | 1-6 |
| 1.2.1 REQUERIMIENTOS GENERALES | 1-6 |
| 1.2.2 MACRONUTRIENTES | 1-6 |
| 1.2.3 MICRONUTRIENTES | 1-7 |
| 1.3 CULTIVO DE MICROALGAS | 1-9 |
| 1.3.1 SISTEMAS DE CULTIVO | 1-9 |
| A) CULTIVOS FOTOTRÓFICOS | 1-10 |
| B) CULTIVOS HETEROTRÓFICOS | 1-11 |
| 1.3.2 TIPOS DE REACTORES | 1-12 |
| A) SISTEMAS ABIERTOS | 1-13 |
| B) FOTOBIOREACTORES | 1-14 |
| 1.4 <i>TETRASELMIS SUECICA</i> | 1-18 |
| 1.4.1 MORFOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN | 1-18 |
| 1.4.2 COMPOSICIÓN | 1-19 |
| 1.4.3 IMPORTANCIA COMERCIAL | 1-20 |
| 1.5 ANTIOXIDANTES Y LAS MICROALGAS | 1-21 |
| 1.5.1 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA | 1-22 |
| 1.5.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN MICROALGAS | 1-24 |
| 1.5.3 APLICACIONES | 1-25 |
| 1.6 EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA SALUD (ENFERMEDADES) | 1-26 |
| 1.7 SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS EN <i>T. SUECICA</i> | 1-28 |

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|---|------|
| 2.1 CULTIVO | 2-1 |
| 2.1.1 MEDIO DE CULTIVO | 2-1 |
| 2.1.2 CULTIVO EN REACTOR DE 80 mL | 2-2 |
| 2.1.3 CULTIVOS EN REACTORES DE 80 mL, 5 L Y 80 L | 2-3 |
| 2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS | 2-6 |
| 2.2.1 RECUPERACIÓN DE BIOMASA | 2-6 |
| 2.2.2 CONCENTRACIÓN CELULAR | 2-6 |
| 2.2.3 PESO SECO | 2-6 |
| 2.2.4 CENIZAS | 2-7 |
| 2.2.5 PROTEÍNAS | 2-7 |
| 2.2.6 CARBOHIDRATOS | 2-8 |
| 2.2.7 LÍPIDOS | 2-9 |
| 2.2.8 ÁCIDOS GRASOS | 2-10 |
| 2.2.9 ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA | 2-12 |
| 2.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE | 2-13 |
| 2.3.1 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS | 2-13 |
| 2.3.2 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES | 2-13 |
| 2.3.3 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS EXTRACTOS DE <i>T. SUECICA</i> | 2-14 |
| 2.3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIRRADICAL | 2-15 |
| A) DPPH | 2-15 |
| B) TEAC | 2-15 |
| C) FRAP | 2-16 |
| 2.3.5 EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS | 2-17 |
| A) TBARS | 2-17 |
| B) BLANQUEAMIENTO DEL β -CAROTENO | 2-18 |
| 2.3.6 DETERMINACIÓN DE α -TOCOFEROL | 2-19 |
| 2.3.7 DETERMINACIÓN DE CLOROFILA Y CAROTENOIDES TOTALES | 2-20 |
| 2.3.8 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FUcoxantina y β -CAROTENO | 2-20 |

| | |
|---|------|
| 2.4 SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS | 2-22 |
| 2.4.1 DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE PARTICIÓN DE COMPUESTOS ESTÁNDARES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN ATPS | 2-23 |
| 2.4.2 UTILIZACIÓN DE ATPS PARA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN MICROALGAS | 2-24 |
| A) RUPTURA CELULAR | 2-24 |
| B) PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS | 2-24 |
| 2.5 APLICACIÓN DE EXTRACTOS DE <i>T. SUECICA</i> EN CÉLULAS CANCERÍGENAS DE PRÓSTATA HUMANA | 2-26 |
| 2.5.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS | 2-26 |
| 2.5.2 ENSAYO CELULAR | 2-27 |
| 2.5.3 MEDICIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) | 2-27 |
| 2.5.4 VIABILIDAD CELULAR | 2-29 |
| 2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 2-30 |

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|--|------|
| 3.1 CULTIVO DE <i>T. SUECICA</i> CON ADICIÓN DE MAGNESIO, SILICIO Y ESTRONCIO AL MEDIO DE CULTIVO | 3-1 |
| 3.1.1 REACTORES COM 80 mL DE CULTIVO | 3-1 |
| 3.1.2 DENSIDAD CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO DE <i>T. SUECICA</i> | 3-2 |
| 3.1.3 PESO SECO LIBRE DE CENIZAS (AFDW) Y PRODUCTIVIDAD | 3-6 |
| 3.1.4 COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA | 3-7 |
| 3.1.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES | 3-9 |
| 3.2 INDUCCIÓN DE MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN <i>T. SUECICA</i> A TRAVÉS DEL ESCALADO DEL CULTIVO Y LA ADICIÓN DE ESTRONCIO | 3-11 |
| 3.2.1 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (μ) DE <i>T. SUECICA</i> CULTIVADA EN REACTORES DE 80 mL, 5 L Y 80 L | 3-11 |
| 3.2.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES Y SÓLIDOS EXTRAÍBLES TOTALES | 3-13 |
| 3.2.3 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE | 3-15 |

| | |
|--|------|
| A) CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH | 3-15 |
| B) CAPACIDAD DE DECOLORACIÓN DEL RADICAL ABTS | 3-15 |
| C) BLANQUEAMIENTO DEL β -CAROTENO | 3-17 |
| D) PODER ANTIOXIDANTE DE LA REDUCCIÓN DEL HIERRO (FRAP) | 3-19 |
| E) SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBRAS) | 3-20 |
| 3.2.4 CONTENIDO DE CAROTENOIDES Y α -TOCOFEROL EN <i>T. SUECICA</i> | 3-21 |
| 3.3 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS EXTRACTOS DE <i>T. SUECICA</i> | 3-23 |
| 3.4 PROCESO DE EXTRACCIÓN NO CONVENCIONAL DE COMPUESTOS ACTIVOS DE <i>T. SUECICA</i> | 3-29 |
| 3.4.1 EFECTO DE SURFACTANTES EN LA LISIS CELULAR DE <i>T. SUECICA</i> | 3-29 |
| 3.4.2 FORMACIÓN DE SISTEMAS ACUOSOS BIFÁSICOS (ATPS) | 3-30 |
| A) EFECTO DE SALES INORGÁNICAS DE SODIO | 3-30 |
| B) EFECTO DE SALES ORGÁNICAS DE SODIO | 3-35 |
| 3.4.3 EXTRACCIÓN DE BIOMOLÉCULAS ANTIOXIDANTES | 3-36 |
| A) SISTEMA MODELO CON BIOMOLÉCULAS ANTIOXIDANTES | 3-36 |
| B) SISTEMA REAL CON LA MICROALGA <i>T. SUECICA</i> | 3-37 |
| 3.5 ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE LOS EXTRACTOS DE <i>T. SUECICA</i> | 3-39 |
| 3.5.1 VIABILIDAD CELULAR | 3-39 |
| 3.5.2 ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA | 3-39 |

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

CAPÍTULO 5: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXO: ARTÍCULOS

CRITERIOS DE CALIDAD DE PUBLICACIONES

- ANEXO 1: EFFECT OF MG, SI, AND SR ON GROWTH AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE MARINE MICROALGA *TETRASELMIS SUECICA* (IN PRESS: J APPL PHYCOL, 2011. DOI 10.1007/s10811-011-9764-2)
- ANEXO 2: EFFECT OF CULTURE SCALE-UP AND STRONTIUM ADDITION ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *TETRASELMIS SUECICA* GROWN IN A SEMICONTINUOUS CULTURE (SENT TO BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING)
- ANEXO 3: SODIUM SALT EFFECT ON AQUEOUS SOLUTIONS CONTAINING TWEEN 20 AND TRITON X-102 (IN PRESS: J. CHEM. THERMODYNAMICS, 2011. DOI 10.1016/J.JCT.2011.09.021)
- ANEXO 4: ON THE DOUBLE ROLE OF SURFACTANTS AS MICROALGA CELL LYSIS AGENTS AND ANTIOXIDANTS EXTRACTANTS (SENT TO GREEN CHEM J.)

RESUMEN

En los últimos años, se ha incrementado el interés por los recursos marinos debido a la gran diversidad y riqueza en su composición, así como la posibilidad de obtener metabolitos que ayuden a mejorar la salud, que sean aditivos en alimentos o sean aplicables en la industria. Uno de los organismos marinos más interesantes y diversos son las microalgas. La ventaja de trabajar con estos organismos es que se puede inducir la producción de metabolitos de interés mediante la modificación de las condiciones de crecimiento. En este sentido, los esfuerzos por incrementar la productividad de los cultivos de microalgas se han centrado principalmente en la mejora de los fotobiorreactores, mientras que se ha dedicado poca atención a los requerimientos nutricionales de las microalgas con el fin de lograr cultivos de alta densidad celular.

En este contexto, el objetivo de la presente Tesis es mejorar la producción de biomasa de la microalga marina *Tetraselmis suecica* y en consecuencia incrementar la producción de compuestos bioactivos, mediante la modificación del medio y el volumen del cultivo. Además se aplicará un proceso de *downstream* respetuoso con el medio ambiente para extraer los compuestos bioactivos intracelulares, para finalmente evaluar el posible potencial antioxidante y posible efecto antiangiogénico en células cancerígenas de próstata. Este objetivo global se aborda a través de tres capítulos principales: introducción, materiales y métodos y resultados y discusión. En este último se realiza una exposición detallada de los resultados obtenidos y los aspectos más destacables descritos en los artículos publicados previamente, así como en los enviados que serán incluidos como Anexos en la presente memoria.

En primer lugar, se presentan los resultados de la evaluación del efecto de la adición de Magnesio (Mg), Silicio (Si) y Estroncio (Sr) a la formulación del medio de cultivo de *T. suecica* con el fin de obtener mayor densidad celular en el estado estacionario de un cultivo semicontinuo. A su vez, se evaluó el efecto de la adición de estos elementos traza en la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales de la biomasa obtenida. Para ello se utilizaron reactores de 80 mL en condiciones de luz, aireación y tasa de renovación del cultivo establecidas previamente como óptimas. Se midieron las variables de crecimiento y la composición de la microalga, así como su peso seco y productividad. Los resultados de esta etapa concluyeron en la recomendación de la adición a la formulación del medio de cultivo de *T. suecica* de Mg y Si, ambos a una concentración de 3 mM, y Sr a una concentración de 10 mM para obtener un cultivo semicontinuo con una elevada densidad celular y por consiguiente una alta productividad.

A continuación, una vez mejorado el cultivo a pequeña escala se pasó a mayor escala, utilizando el medio seleccionado siempre que fue posible, y se analizó la actividad antioxidante de los extractos obtenidos, dado el potencial que estos compuestos pueden tener en diversos sectores, como el médico y el alimentario. Los cultivos se realizaron en 2 formulaciones del medio de cultivo: tradicional o control y con adición de Sr a una concentración 10 mM. Además se realizaron en 3 diferentes escalas: 80 mL, 5 L y 80 L de volumen de operación. De la biomasa obtenida en estos cultivos, se prepararon extractos utilizando diferentes disolventes: metanol, etanol y metanol:agua (50%). Posteriormente, a cada extracto se evaluó la actividad antioxidante utilizando métodos de actividad antirradical (DPPH, TEAC y FRAP) y de protección de la peroxidación de lípidos (TBARS y blanqueamiento del β -caroteno). También se midió el contenido de pigmentos y α -tocoferol. Con los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que el escalado del cultivo tuvo un efecto importante en la actividad antioxidante de *T. suecica*: a mayor volumen de reactor, mayor actividad antioxidante. Sin embargo, la adición de Sr tuvo un efecto negativo en la actividad antioxidante, pero el efecto es positivo en el contenido de carotenos como fucoxantina y β -caroteno. Esto representa una oportunidad para mejorar el contenido de pigmentos y compuestos en la microalga para incrementar su potencial antioxidante para su uso posterior en diversas áreas de interés.

Por otra parte, se buscó comprobar la presencia de polifenoles e identificarlos en los extractos de *T. suecica*; se analizaron los extractos del cultivo control del reactor de 80 L, que fue la condición en la que se obtuvo la mayor actividad antioxidante y el mayor contenido de polifenoles. Para ello se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas para obtener los espectros de masas, y por comparación con la base de datos NIST, se identificaron los compuestos fenólicos presentes. Aunque está publicado el contenido de polifenoles totales en *T. suecica*, no lo está su caracterización y con los resultados obtenidos en este trabajo se demuestra que los compuestos fenólicos que posee no son los tradicionales y hasta el momento no han sido reportados en ninguna otra microalga.

Dado que en la actualidad se buscan procesos de extracción cada vez más eficientes y sostenibles ambientalmente, se ha tratado de obtener los compuestos activos de microalgas a través de los sistemas bifásicos acuosos (ATPS), utilizando sales y diversos surfactantes. Los resultados obtenidos son prometedores y ya han sido publicados. La estrategia seguida en este estudio consistió en la evaluación de la habilidad de 6 sales de sodio (Na_2CO_3 , Na_2SO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Na_2SO_3 , NaH_2PO_4 y NaCH_3COO) como promotoras de la formación de fases en disoluciones acuosas con Tween 20 y Tritón X-102. Estos surfactantes se seleccionaron por ser de los más representativos de las familias: polioxietileno (20) monolaurato de sorbitan (Tween 20) y polioxietileno t-octilfenol (Triton X-102). Ambos son ampliamente utilizados en la industria y son clasificados como biodegradables. Finalmente, se utilizaron ecuaciones empíricas para correlacionar las curvas de solubilidad y los resultados de las líneas de reparto. También en los ATPS formados con las sales de sodio: citrato, tartrato y carbonato, y los surfactantes Tween 20 y Tritón X-102, se estudió la separación de compuestos estándares: α -tocoferol, β -caroteno y ácido gálico. Además se estudió el efecto surfactante en la lisis celular para posteriormente aplicar el ATPS para la extracción de antioxidantes intracelulares de *T. suecica*. Uno de los aspectos importantes que se evaluaron fue la bioactividad de los compuestos extraídos con los ATPS y los resultados mostraron que se mantiene la actividad medida a través de un método de protección de peroxidación de lípidos (TBARS),

mostrando que en la fase rica en surfactante del sistema se quedan retenidos la mayor proporción de los compuestos con actividad antioxidante.

Finalmente, los extractos de *T. suecica* obtenidos con diferentes disolventes y métodos de extracción se aplicaron en células cancerígenas de próstata (PC3) para evaluar su efecto antiangiogénico. Los resultados son prometedores, especialmente en uno de los extractos (extracto metanólico de *T. suecica*), ya que presenta una baja citotoxicidad y hasta un 50% más actividad antiangiogénica que el control

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 LAS MICROALGAS Y SUS APLICACIONES

1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las microalgas son algas unicelulares que existen individualmente o en grupos y son consideradas uno de los organismos vivos más antiguos. Son la base de la cadena alimentaria en los sistemas acuáticos, formando el fitoplancton (Satyanarayana *et al.* 2011), y son responsables de más del 50% de la productividad fotosintética primaria en la tierra, representando fábricas solares para un amplio rango de productos potencialmente benéficos (Milledge 2011). La fotosíntesis es un proceso que usa la energía de la luz solar junto con agua y dióxido de carbono para producir oxígeno y carbohidratos, y convierte la energía solar en energía química (Hosikian *et al.* 2010).

Debido a la estructura celular sencilla de las microalgas, la acumulación de energía química después del proceso fotosintético no se desperdicia en la construcción de estructuras complejas, sino que se orienta a un uso más eficiente de formación de nuevas células (Satyanarayana *et al.* 2011). En este sentido, los microorganismos fotosintéticos son la base de todas las cadenas alimenticias, y por tanto de la vida en el planeta (Hosikian *et al.* 2010).

En vista de que las microalgas tienen mayor capacidad fotosintética que las plantas, son capaces de sintetizar un gran número de sustancias. Hasta la fecha, estos microorganismos han sido poco explorados, sobre todo los de origen marino, representando una oportunidad para descubrir nuevos metabolitos y producirlos de forma eficiente y económica. La importancia de los recursos marinos, la diversidad de las especies de microalgas que existen y la facilidad de su cultivo puede ser la

solución a la necesidad de nuevos ingredientes funcionales de origen natural (Fig. 1.1). Estos recursos constituyen ahora la base de un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas (Guedes *et al.* 2011).

Aunque en China se han usado las microalgas desde hace miles de años, su cultivo a escala industrial ha sido objeto de un gran interés académico e industrial durante los últimos años (Milledge 2011). El hecho de que las microalgas se hayan convertido en una fuente inagotable de nuevas sustancias con aplicación en muchas áreas se debe a su diversidad excepcional y a que representan un grupo de organismos altamente especializado que puede adaptarse a hábitats variados. Las microalgas presentan ventajas indudables en relación a las plantas por su rápido crecimiento, alto rendimiento de una gran cantidad de biomoléculas y la posibilidad de uso de cualquier tipo de agua para su cultivo (Satyanarayana *et al.* 2011). Adicionalmente, las microalgas marinas tienen características bioquímicas únicas no encontradas en las plantas superiores.

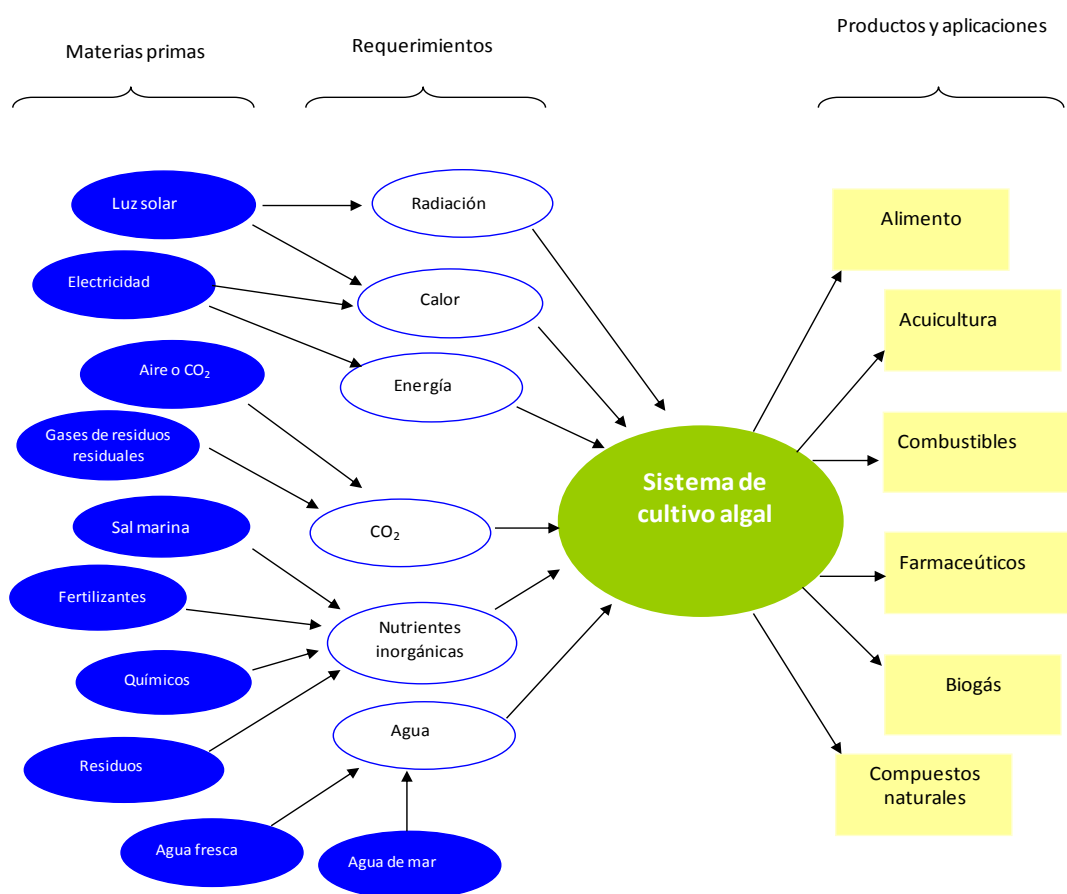


Figura 1.1. Sistema de cultivo algal: requerimientos, productos y aplicaciones de la biomasa microalgal (Adaptado de Becker, 1994).

1.1.2 COMPOSICIÓN

La versatilidad del metabolismo de las microalgas las hace extremadamente interesantes; además de ser la biomasa que presenta un crecimiento más rápido, su cultivo controlado supone ventajas relativas a su capacidad de almacenamiento de CO₂, acumulación de lípidos (para producción de biodiesel), producción de fitometabolitos (para una nueva generación de productos farmacéuticos) y fitodepuración (Belotti *et al.* 2010).

Como las microalgas poseen estructuras sencillas su composición consiste básicamente en carbohidratos, proteínas y lípidos, aunque también son fuente de vitaminas como la A, B₁, B₂, B₆, C, y E. Las microalgas tienen un alto contenido en proteínas, sobre todo de aquéllas usadas como fuente de nutrientes. En cuanto a los carbohidratos, éstos se encuentran principalmente como almidón, glucosa y otros polisacáridos de alta digestibilidad.

El contenido de lípidos para uso en alimentos varía entre 1 y 35%, mientras que el porcentaje para ser usados como biocombustibles está entre el 20 y 80%, comparado con el 15% al 30% que se utiliza de los aceites vegetales. En cualquier caso, factores ambientales, el tipo de cosecha y el método de secado de las células determinan la cantidad de sustancias potencialmente útiles en las microalgas (Satyanarayana *et al.* 2011).

La productividad y la composición bioquímica de las microalgas depende en gran medida del modo de cultivo, la composición del medio y el perfil de nutrientes que permiten incrementar o inhibir el crecimiento mediante la optimización de factores como el control de la concentración de nitrógeno, intensidad luminosa, temperatura, salinidad, concentración de CO₂ y el método de cosecha (Brennan y Owende 2010). Estos microorganismos poseen la ventaja extra de poseer un metabolismo flexible, aunque este hecho puede conllevar la dificultad de optimización de los procesos de producción de compuestos bioactivos, ya que su estado fisiológico será decisivo para incrementar o disminuir el rendimiento final (ej. estresado vs. no estresados). Por lo tanto, su metabolismo secundario puede ser fácilmente modulable por factores de estrés aplicados externamente, por ejemplo con la deficiencia de la fuente de nitrógeno (Guedes *et al.* 2010).

1.1.3 APLICACIONES

La biotecnología de microalgas ha sido desarrollada para diferentes aplicaciones comerciales en sectores tan diversos como el alimentario, energético, farmacéutico, sanitario y medioambiental (Harun *et al.* 2010). Como organismos fotosintéticos que son, las microalgas contienen clorofila que puede ser usada para alimentos y cosméticos.

Las microalgas pueden dar lugar a una alta productividad lipídica lo que redundará en el interés de su aprovechamiento en industria alimentaria para la aplicación en alimentos funcionales. De este modo, es destacable el uso de algunas especies de *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella* para la producción de aditivos alimentarios en nutrición humana. Por otra parte, también se ha de destacar el uso de microalgas en biocombustibles, puesto que los ácidos grasos obtenidos a partir de ellas se utilizan para la producción de biodiesel, hidrógeno y metano mediante digestión anaeróbica. Las microalgas también se han enfocado a la alimentación para animales y a la acuicultura, principalmente como alimento para moluscos, zooplancton, larvas de crustáceos y peces (Ponomarenko *et al.* 2004, Carballo-Cárdenas *et al.* 2003).

Adicionalmente, las microalgas tienen aplicación como biofertilizantes y su uso se ha extendido al tratamiento de aguas residuales para eliminar contaminantes químicos como nitritos, nitratos, fósforo, metales pesados (Cr^{+3} , Cd^{+2} , Cu^{+2} y otros) y contaminantes orgánicos como hidrocarburos aromáticos, fenoles y disolventes orgánicos, además de eliminar los patógenos del agua residual (Brennan y Owende 2010).

Por otra parte, se ha demostrado que ciertas especies de microalgas producen diferentes compuestos con actividad antibacteriana, antiviral, anticancerígena, antioxidante y antifúngica (Rodríguez-Meizoso *et al.* 2010).

Así, microalgas como *Chlorella* pueden ser empleadas para el desarrollo de alimentos funcionales con potenciación inmunológica para prevenir enfermedades, debido a sus efectos antitumorales, hepatoprotectores, inmunoestimulantes, antibacterianos y antioxidantes. Dentro de estos últimos, es destacable la presencia de antioxidantes naturales como la luteína, el β -caroteno, el ácido ascórbico y el α -

tocoferol, que son compuestos con la capacidad de inhibir los radicales libres (Plaza *et al.* 2009). Hasta ahora, la aplicación más significativa de este tipo de compuestos bioactivos se centra en el sector cosmético y alimentario, debido a su capacidad de disminuir la formación de radicales libres de las células y tejidos en el organismo humano.

1.2 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LAS MICROALGAS

1.2.1 REQUERIMIENTOS GENERALES

La disponibilidad de nutrientes y la fuente de energía son elementos clave para la biosíntesis de los componentes celulares en el crecimiento, reproducción y mantenimiento de la vida. Las microalgas, al ser organismos fotoautótrofos, dependen de la luz (que puede ser suministrada por el sol o por lámparas de luz fría), de temperatura adecuada, de una fuente de carbono (proviene del CO₂), hidrógeno y oxígeno. Además, necesitan de macronutrientes como nitrógeno, fósforo, magnesio, calcio y azufre, micronutrientes como hierro, cobre, molibdeno, manganeso, sodio, cobalto, vanadio y silicio, y de factores de crecimiento como las vitaminas del complejo B (biotina, tiamina y cianocobalamina) (Zaborsky 1983).

1.2.2 MACRONUTRIENTES

Los macronutrientes son esenciales para las microalgas en cantidades de g por litro de medio de cultivo y son necesarios para la síntesis de los compuestos celulares, ya que forman parte de su estructura.

El nitrógeno forma parte de las proteínas funcionales y estructurales y de los ácidos nucleicos de la célula. La fuente más común de nitrógeno son los compuestos de amonio y nitratos. Cuando se utiliza nitrato (N⁺⁵), éste es reducido al nivel de amonio (N⁻³) antes de ser incorporado a compuestos orgánicos. La mayoría de las algas verdes son capaces de sintetizar todos los compuestos nitrogenados que requieren para su crecimiento a partir de fuentes de nitrógeno inorgánico, como los mencionados anteriormente.

En cuanto al fósforo, se ha de decir que juega un papel importante en todas las microalgas, en concreto para la síntesis de los ácidos nucleicos, en las reacciones intermedias del metabolismo de carbohidratos y especialmente en las reacciones de transformación de energía, formando parte de compuestos responsables de la transferencia de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP) y fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido (NADP) (Waites *et al.* 2001). Cantidades menores a 50 µg/l limitan el crecimiento de las algas verdes y el nivel óptimo está entre 100 y 2000 µg/l.

El magnesio es un constituyente indispensable de la molécula de clorofila y cofactor de diversas enzimas asociadas con la fotosíntesis y la respiración, sobre todo en los procesos de fosforilación. Una de esas enzimas importantes es la Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) que cataliza el primer paso de la red fotosintética de la asimilación del CO₂ atmosférico y de la oxidación del carbono en la foto-respiración (Spreitzer *et al.* 2002). Se ha comprobado sobre un extracto crudo de *Dunaliella Tertiolecta* (Clorofita), que la actividad de Rubisco ha sido regulada como respuesta a la concentración de Mg⁺² en forma de MgCl₂, y que conforme aumenta la concentración de éste, aumenta la actividad enzimática, mostrando la mayor actividad a una concentración 20 mM de MgCl₂ (MacIntyre, *et al.* 1997).

1.2.3 MICRONUTRIENTES

Los micronutrientes son aquellos que son requeridos por las microalgas en cantidades de mg ó µg, y que juegan un papel crucial para el adecuado funcionamiento enzimático celular.

El primer elemento a destacar es el silicio. Este es el segundo elemento más abundante después del oxígeno; representa alrededor de una cuarta parte de la masa terrestre, como dióxido de silicio y varios silicatos. La forma de ácido ortosilícico está directamente disponible para ser utilizado por organismos fotosintéticos (Tréguer *et al.* 1995). Algunos estudios han apuntado a que la deficiencia de silicio provoca una disminución de la incorporación de fósforo y de azufre, así como de la capacidad fotosintética, modificando de este modo la composición bioquímica de la célula a nivel de la síntesis lipídica y de carbohidratos (Coombs *et al.* 1967).

Se ha comprobado que el silicio tiene un efecto positivo en el crecimiento de las diatomeas, pero un efecto negativo en su producción de lípidos. Así, la utilización de concentraciones bajas de silicio en el medio provocará una mayor síntesis de lípidos en la célula, afectando por tanto a la producción de ácidos grasos poliinsaturados (Lebeau y Robert, 2003). Sin embargo, Coradin *et al.* (2006) no limitan la función del silicio a las diatomeas, sino que establecen que el silicio es un elemento indispensable para el cultivo de microalgas y para todos los organismos fotosintéticos.

Con respecto al estroncio, éste no se considera un nutriente esencial para las microalgas ya que es un componente menor en la naturaleza. No obstante, debido a la contaminación con metales pesados detectada en el ambiente marino durante los últimos años, el estroncio ha afectado a la salud humana y de algunos animales ya que puede reemplazar el calcio en los huesos causando algunas enfermedades como osteoartritis (Li *et al.* 2006). Así pues, aunque el estroncio no se asocia hasta el momento con el crecimiento o modificación de la composición bioquímica de las microalgas, sí se ha probado la capacidad de bioacumulación de este metal en microorganismos, principalmente bacterias, levaduras y microalgas, un hecho que resulta de especial interés de biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados (Faison *et al.* 1990; Avery *et al.* 1999).

Además, las microalgas presentan bajos requerimientos de hierro para el proceso de oxidación-reducción biológica y para la producción de clorofila. El manganeso es vital para la síntesis de clorofila y la utilización del O_2/CO_2 en la fotosíntesis. Adicionalmente, se requieren trazas de elementos como el cobalto y zinc para la síntesis y estructura del ARN, boro y cobre para la fotosíntesis y molibdeno para la asimilación y reducción de los nitratos. También, algunas microalgas presentan un requerimiento de pequeñas cantidades de vitaminas, principalmente del complejo B. Los atributos nutricionales de las microalgas dependen en gran medida de factores intrínsecos, como su composición bioquímica, tamaño, digestibilidad de la pared celular y su baja toxicidad (Carvalho *et al.* 2006).

1.3 CULTIVO DE MICROALGAS

1.3.1 SISTEMAS DE CULTIVO

El cultivo de microalgas se puede llevar a cabo mediante diversos modos de operación: discontinuo o *batch*, semicontinuo o *fed-batch* y continuo. Se ha demostrado que la operación en continuo es una opción viable para el cultivo de microalgas, ya que de este modo se alcanzan mayores productividades, se facilita una elevada homogeneidad del producto y una mayor regularidad de la producción. No obstante, su mantenimiento y control es difícil y se opta por el cultivo semi-continuo en régimen de quimiostato que ha sido ampliamente utilizado para estudiar la ecología y bioquímica de las microalgas, pero con la variante de que incluye ciclos de luz/oscuridad imitando el proceso en la naturaleza. Para evitar confusiones, al cultivo en quimiostato con esta variante de sincronización mediante ciclos de luz/oscuridad se le ha denominado ciclostato (Gotham y Rhee, 1982). El cultivo semicontinuo en ciclostato, aunque metodológicamente es distinto de un quimiostato, se ajusta a los modelos de crecimiento de un sistema en continuo.

El cultivo de microalgas con diferentes tasas de renovación (donde un porcentaje del volumen de cultivo viejo es retirado antes de adicionar medio de cultivo fresco con la misma concentración de nutrientes que la alimentación inicial) y distinta concentración de nutrientes, permite modificar la composición bioquímica y controla el valor nutricional de la microalga (Otero y Fábregas, 1997; Fábregas *et al.* 1995). Un incremento en las variables del cultivo antes mencionadas conllevará un incremento considerable de la supervivencia, el crecimiento, la tasa de conversión de alimento y la transformación reproductiva de especies marinas alimentadas con

Tetraselmis suecica (Fábregas *et al.* 1995) y *Phaeodactylum tricornutum* (Fábregas *et al.* 1996).

En el estado estacionario (*steady-state*) del cultivo microalgal en régimen semicontinuo se mantiene tanto la densidad celular como la composición bioquímica de las células recolectadas, ya que se ha comprobado que las muestras en varios puntos del estado de equilibrio no difieren significativamente en su composición bioquímica (Otero, 1995 y Fábregas *et al.* 2001).

A) CULTIVOS FOTOTRÓFICOS

El cultivo fototrófico es aquel que utiliza la luz como fuente de energía y el CO₂ como fuente de carbono (Huang *et al.* 2010). En base en lo anterior, las condiciones de cultivo deben proporcionar estos dos requerimientos básicos de las microalgas, además de aportar los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para un desarrollo óptimo. En este sentido, en los cultivos autotróficos se suministra la luz necesaria para la fotosíntesis a través de dos fuentes: lámparas de luz o luz solar.

Cuando se requiere una producción controlada de biomasa, se utilizan lámparas de luz, ya que de este modo se asegura que la intensidad luminosa que incide sobre el cultivo es siempre la misma en el ciclo de luz correspondiente, lo que permite que no haya variación en la composición celular. Este hecho es especialmente relevante cuando se trata de un cultivo semicontinuo, donde se ha demostrado que la composición celular se mantiene constante con el paso del tiempo siempre y cuando se mantengan estables los parámetros mencionados. Esta fuente de luz normalmente se utiliza a nivel laboratorio y planta piloto, lo que conlleva un alto coste por consumo de energía.

Cuando el objetivo es la producción a gran escala con altas productividades volumétricas y alto rendimiento de biomasa, se suele utilizar la luz solar, ya que permite disminuir considerablemente los costes de producción (Zijffers *et al.* 2010). Sin embargo, cuando se trabaja al aire libre, los cultivos están expuestos a cambios ambientales que podrían afectar al desarrollo normal de la microalga. Debido a ello, es común la utilización de gases de combustión ricos en CO₂, que previenen la

limitación de la fuente de carbono y permiten por consiguiente, que la productividad pueda mantenerse a niveles elevados.

En este tipo de sistemas fotosintéticos la disponibilidad de luz es considerada un nutriente limitante. Debido al ciclo natural de la luz del día, las células de microalgas están expuestas a la limitación, saturación y sobresaturación de las condiciones de luz. Así, durante la primavera y el verano, la fotosíntesis puede saturarse muy pronto por las mañanas, provocando una sobresaturación del sistema que cause a su vez fotoinhibición en el cultivo durante las horas centrales del día (Cuaresma *et al.* 2011). La intensidad de incidencia de energía solar en el reactor está cambiando continuamente, y en este caso la irradiación externa es una variable que no se puede controlar durante la operación y que afectará considerablemente a la tasa de crecimiento (Fernández *et al.* 2004).

La mayor ventaja de usar el cultivo autotrófico para producir microalgas es el consumo de CO₂ como fuente de carbono para el crecimiento celular. Así, cuando se utiliza el CO₂ como única fuente de carbono, uno de los criterios utilizados para seleccionar el emplazamiento de la planta podría radicar en la cercanía a fábricas o plantas de energía que podrían proveer una gran cantidad de CO₂ para el cultivo. Por otra parte, comparado con otro tipo de cultivos, el problema de contaminación es menos severo cuando se usa crecimiento autotrófico (Chen *et al.* 2011). El cultivo autotrófico es considerado el método más deseable para el cultivo de microalgas ya que la luz solar es una fuente gratuita que redundará en una mayor eficiencia del proceso biológico (Azma *et al.* 2011).

B) CULTIVOS HETEROTRÓFICOS

Cuando una microalga usa carbón orgánico como fuente de carbono y energía se denomina cultivo heterotrófico. Algunas especies de microalgas tienen la capacidad de crecer no sólo bajo condiciones fototróficas, sino que también pueden usar carbono orgánico en condiciones de oscuridad. Este tipo de cultivos tiene la ventaja de que no está limitado por la luz cuando se tienen altas densidades celulares a gran escala como en el cultivo fototrófico (Chen *et al.* 2011).

La optimización de los cultivos fotoautotróficos al aire libre requieren un evaluación de la densidad celular óptima para que el crecimiento se lleve a cabo

durante el día y alguna estrategia para minimizar la pérdida de biomasa por la noche. La incorporación de nutrientes orgánicos cambia este concepto, logrando mantener el potencial de mayores densidades celulares, que se consideran óptimas para la operación autotrófica y podría reducir las pérdidas por la noche si un nutriente orgánico se puede usar durante la mayor parte del período de oscuridad (Fernández *et al.* 2004).

Las microalgas pueden asimilar una gran variedad de fuentes orgánicas de carbono para su crecimiento, como glucosa, acetato, glicerol, fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa y manosa. Actualmente se está incidiendo más en aspectos tales como la búsqueda de nuevas fuentes de carbono más económicas como el hidrolizado de harina de maíz en lugar de azúcares, obteniendo mayor productividad de biomasa y de lípidos (Chen *et al.* 2011).

Algunas especies de microalgas utilizadas en acuicultura han sido cultivadas en condiciones heterotróficas en biorreactores de tanque agitado. Por ejemplo, *Nitzschia laevis*, *Cryptocodinium cohnii*, *Chlorella protothecoides* y *Galdieria sulphuraria* han sido utilizadas para la producción de ácido eicosapentanoico, ácido docohexanoico, biodiesel y ficocianinas, respectivamente.

Se han descrito diferentes ventajas de los cultivos en biorreactor, como una baja relación volumen/superficie, la posibilidad de escalado sin necesidad de una instalación auxiliar para captar energía solar, o la posible utilización de cultivos axénicos libres de bacterias patógenas para la producción en serie de lotes puros de los productos deseados con una composición bioquímica consistente. Las microalgas cultivadas con este método alcanzan una tasa de crecimiento alta y se produce una alta concentración celular. *T. suecica* también ha sido cultivada heterotróficamente, mejorando la densidad celular del cultivo y la productividad, además de aumentar la cantidad de lípidos que contiene la célula (Azma *et al.* 2011). Sin embargo, la composición bioquímica de la célula va a estar afectada por la fuente de carbono utilizada en el cultivo heterótrofo de *T. suecica* (Cid *et al.* 1992).

1.3.2 TIPOS DE REACTORES

Se han utilizado una gran diversidad de reactores para el cultivo de microalgas. A pequeña escala, los reactores presentan formas tubulares, cilíndricas y

esféricas con volúmenes desde 50 ml hasta 5 L, fabricados principalmente en vidrio. A gran escala, los materiales varían desde metacrilato hasta polímeros especialmente diseñados para cada caso específico siendo la principal característica el permitir el paso de la luz hacia el reactor tanto en los casos situados al aire libre como en aquéllos que utilizan fuente de luz artificial. A esta diversidad también se unen las diferencias en tamaños, diseños y materiales, que permite el cultivo de las microalgas en condiciones poco habituales.

A) SISTEMAS ABIERTOS

La facilidad de producción de microalgas es un factor importante a ser considerado para la producción óptima de una especie microalgal específica. Por lo tanto, es importante analizar las diversas tecnologías existentes a la hora de maximizar la producción de un metabolito a partir del cultivo de microalgas con un bajo coste (Harun *et al.* 2010).

Aunque el uso de los sistemas de cultivo abiertos es bastante común, éstos presentan una serie de inconvenientes tales como la intensidad de la luz, temperatura, pH y la concentración de oxígeno disuelto, además de problemas con contaminantes y predadores que pueden limitar el sistema de cultivo. A su favor está el aspecto económico ya que tienen un coste inicial bajo. Los reactores (estanques) abiertos tienen diferentes formas (Fig. 1.2) y cada uno tiene sus ventajas y desventajas. Los tipos de estanques normalmente usados en la investigación y en la industria incluyen los de carriles, que son poco profundos y con forma circular. Adicionalmente, existen factores críticos como el tipo de tanque, la cepa de microalga y la cantidad de luz para la fotosíntesis. Debido al escaso control que implican los sistemas abiertos, en primer lugar se necesitará una aclimatación local, que estará influida decisivamente por la localización elegida (Harun *et al.* 2010). La calidad inferior en el control del proceso provocará que el cultivo en estanques abiertos solo sea factible para un rango limitado de especies de microalgas (Lee 2001).

A pesar de estas limitaciones, en la actualidad se utilizan sistemas abiertos para la producción comercial de β -caroteno a partir de la microalga *Dunaliella*, siendo la localización de la planta, el parámetro más significativo a la hora de implementar este proceso. Debido a ello, las plantas de producción de *Dunaliella*

están localizadas en áreas de clima cálido y seco, con nubosidad mínima y situado cerca de una fuente adecuada de agua salada (Tafreshi y Shariati *et al.* 2006). También se logró una eficiencia fotosintética estable con *Chlorella sp* y *Chlorophyte sp* en sistemas de canales, mientras que *Muriellopsis sp* ha sido cultivada en tanque abierto con agitación para producir células ricas en luteína (Harun *et al.* 2010).



Figura 1.2. Tanques abiertos y al aire libre para el cultivo de microalgas a gran escala. www.renovables-energia.com

B) FOTOBIORREACTORES

A diferencia de los reactores abiertos, los fotobiorreactores permiten el cultivo de las microalgas en condiciones controladas de nutrientes, temperatura, transferencia de gases (CO_2 disuelto), pH, evaporación del medio de cultivo y prevención de agentes contaminantes.

Sin embargo, los fotobiorreactores tienen un alto coste inicial y son muy específicos para la fisiología de la cepa de microalga que se va a cultivar. El ambiente controlado de los fotobiorreactores permite alcanzar una alta productividad, que es el indicador más importante a tener en cuenta a la hora de diseñar este tipo de procesos biológicos.

Básicamente, los fotobiorreactores se basan en diseños: tubulares y planos. La gran superficie de iluminación del reactor, la cual debe ser de un material translúcido, es el principal factor a tener en cuenta (Harun *et al.* 2010). Los reactores tubulares se pueden organizar de diversas formas, dependiendo de las especificaciones del sistema. Las configuraciones más comunes son en línea recta y con flexiones (Fig. 1.3). La geometría del reactor también es otro aspecto a considerar, debido a que los reactores tubulares pueden tener una configuración vertical (Fig. 1.4), horizontal o inclinada. La mayor diferencia entre las configuraciones es que el diseño vertical permite una mejor transferencia de masa y menor consumo de energía, mientras que el reactor horizontal es más fácilmente escalable, pero requiere una mayor área de terreno para la implantación (Ugwu *et al.* 2008).



Figura 1.3. Fotobiorreactor tubular. www.oilgae.com

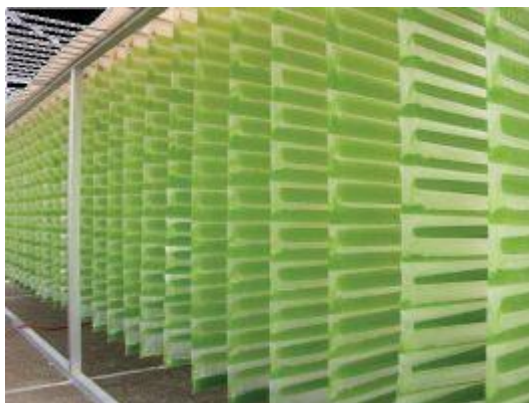


Figura 1.4. Fotobiorreactor de columnas vertical. www.oilgae.com

Por otra parte, el fotobiorreactor plano (Fig. 1.5) permite alcanzar niveles de densidad celular superiores en más de un orden de magnitud a los logrados con otras configuraciones. Adicionalmente, este tipo de reactores presentan ventajas como: 1) bajo consumo de energía y alta capacidad de transferencia de masa, 2) baja acumulación de oxígeno, 3) no hay volumen muerto comparado con grandes desgasificadores y otros biorreactores y 4) una alta eficiencia fotosintética.

Como ya se ha expuesto previamente, otro de los aspectos cruciales a tener en cuenta para diseñar un reactor apropiado es el material de construcción y su geometría (vidrio, PVC transparente, forma de “V”, inclinados, etc.). Los de vidrio y PVC deben poseer una gran transparencia para permitir la máxima penetración de la luz. Como es lógico, los costes de este tipo de sistemas de cultivo han de ser tenidos en cuenta, ya que los sistemas cerrados son habitualmente más caros que los sistemas abiertos (Harun *et al* 2010).

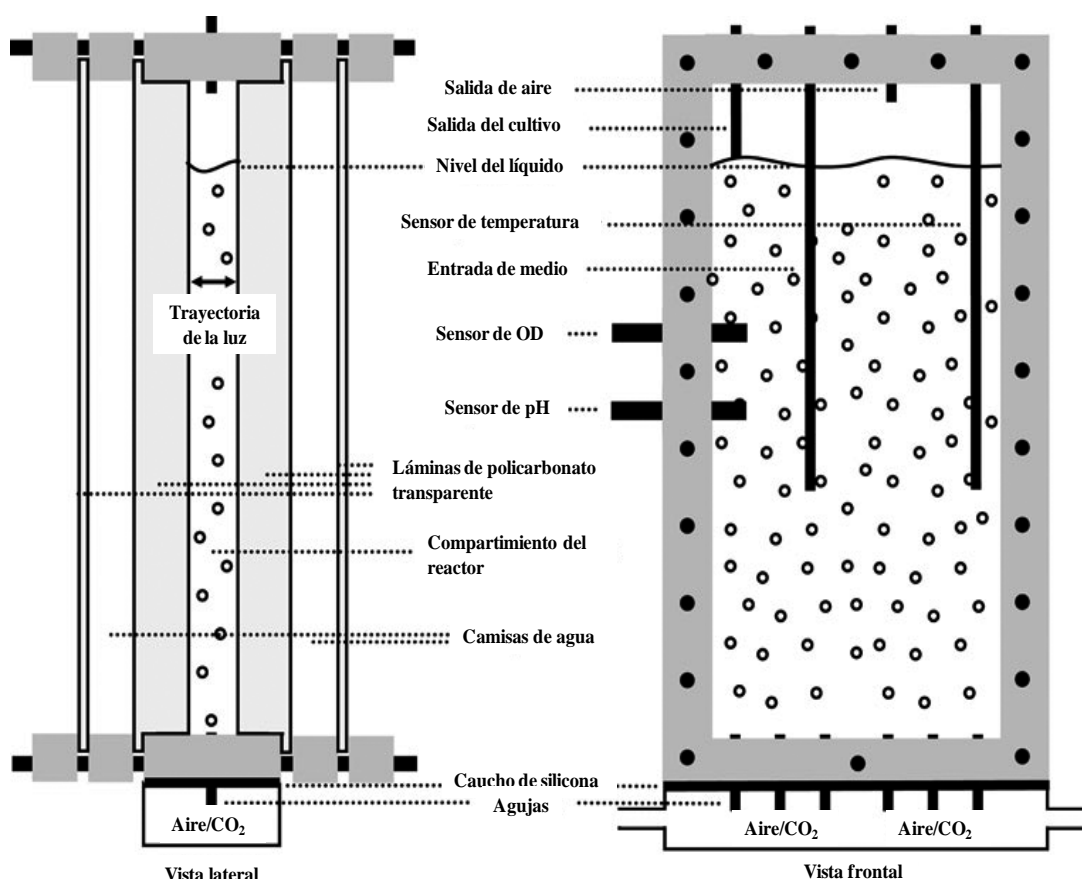


Figura 1.5. Vista lateral y frontal de un fotobiorreactor plano (Zijffers *et al.* 2010).

A tenor de lo expuesto, la adecuada selección de un tipo de reactor ha de basarse en los siguientes requisitos: 1) una efectiva y eficiente fuente de luz; 2) suministro del dióxido de carbono y reducción al mínimo de las pérdidas; 3) eliminación del oxígeno generado fotosintéticamente que puede inhibir el metabolismo o dañar al cultivo si se permite su acumulación; y 4) contar con una adecuada tecnología de fotobiorreactores para maximizar la fiabilidad del escalado del cultivo (Weissman *et al.* 1988).

1.4 *TETRASELMIS SUECICA*

1.4.1 MORFOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN

El género *Tetraselmis*, corresponde a microalgas marinas unicelulares móviles y con color verde, debido a la presencia de clorofila a y b; *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher está considerado como el flagelado marino más fácil de cultivar a gran escala y se utiliza como alimento para larvas de moluscos y crustáceos, con un valor nutritivo considerable.

Tetraselmis suecica, inicialmente denominada *Platymonas* se clasificó en la clase *Chlorophyceae*, pero actualmente se clasifica en la clase *Prasinophyceae*, dentro de la división *Clorophyta*. Es una microalga marina unicelular de color verde, con forma generalmente oval con 4 flagelos isodinámicos que salen de una invaginación apical que se observa en la porción anterior de la célula y que está ubicada en la misma dirección en la que avanza (Fig. 1.6). Su tamaño celular es de alrededor de 10 micrómetros de diámetro, aunque regularmente, mediante granulometría láser se determinó que mide 8 micrómetros (Morineau *et al*, 2001).



Figura 1.6. Fotografía de una célula de *Tetraselmis suecica*.

La reproducción se realiza por división celular binaria, momento en el cual las células pierden el estado móvil, y las dos células hijas ya están completamente flageladas antes de la liberación de la teca (Butcher 1959).

1.4.2 COMPOSICIÓN

T. suecica es una de las especies más utilizadas en acuicultura y es considerada una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Fábregas *et al.* 2001). Además, presenta una riqueza destacable en cuanto a su composición bioquímica, aunque ésta depende de las condiciones de operación, la composición del medio y el sistema de cultivo. Así se tiene que en cultivos heterotróficos, *T. suecica* tiene una composición celular proximal de proteína del 10.5%, carbohidratos 51.9% y de lípidos 14% (Azma *et al.* 2009). Cuando se aplican diferentes tasas de renovación (del 10 al 50%) el contenido de proteína varía desde un 13% a un 22%, el de carbohidratos desde un 6% a 42% y el de lípidos se mantiene más constante, con un contenido que va desde un 8.9% hasta un 10.8% (Fábregas *et al.* 2001). Otros autores que han producido biomasa de esta microalga en cultivo semicontinuo, obtuvieron una composición de 45% de proteína, 13% de carbohidratos y 32% de lípidos (Chini-Zittelli *et al.* 2006), y observándose además que el contenido de los ácidos grasos alcanzaba un promedio del 4.6% del peso celular (Seixas *et al.* 2008), donde el 2% corresponde a ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's, por sus siglas en inglés). Los ácidos grasos presentes en la célula se muestran en el siguiente orden de abundancia: 16:0 (palmítico) > 18:1 ω -9 (oleico) > 18:3 ω -3 (linolénico) > 16:4 ω -3 > 18:2 ω -6 (linoleico) > 20:5 ω -3 (ácido eicosapentanoico, EPA) > 18:4 ω -3 (estearidónico), siendo el 16:0 el ácido graso saturado más abundante y el 18:3 ω -3 el ácido graso poliinsaturado más abundante (Mendoza *et al.* 2010; Otero y Fábregas 1997).

T. suecica, además de ser rica en proteínas, lípidos y carbohidratos, contiene α -tocoferol (Vit. E), carotenoides (como fucoxantina y β -caroteno) y como toda planta verde, contiene clorofila. La cantidad de todos estos componentes también variará en función de las condiciones y el sistema de cultivo (Carballo-Cárdenas *et al.* 2003). *T. suecica* contiene también esteroides de 28 átomos de carbono con cantidades de hasta 29 mg/g de peso seco, siendo los principales el campesterol (24-

metilcolesterol) y el 24-metilen-colesterol, que representan más del 90% del total de esteroides presentes en esta microalga (Fábregas *et al.* 1997; Lin *et al.* 1982; Patterson *et al.* 1993).

Se ha aprovechado la composición de ácidos grasos y esteroides que contiene *T. suecica* para usarlos como marcadores en la cadena alimenticia, ya que al ser utilizada como alimento vivo en acuicultura permite seguir el perfil de estos compuestos a través de la cadena trófica.

1.4.3 IMPORTANCIA COMERCIAL

Como se ha mencionado, *T. suecica* es ampliamente utilizada en acuicultura como alimento vivo para larvas de moluscos, crustáceos y peces y de ahí parte su importancia comercial. Sin embargo, en los últimos años se ha aprovechado la composición y facilidad con la que se puede manipular para producir metabolitos de interés comercial y para obtener biodiesel a partir de microalgas (Chisti 2007). *T. suecica* es una de las microalgas con más potencial para la producción de biodiesel, no tanto por la productividad de lípidos que alcanza, sino por su alta productividad celular y por la facilidad de su cultivo en sistema continuo (Rodolfi *et al.* 2009).

Además, otro campo emergente es la producción de antioxidantes a partir de microalgas, ya que estos compuestos, como ya se ha explicado previamente, se están aplicando en sectores diversos como el cosmético, alimentario, y sanitario (Lee *et al.* 2009). También en este caso, *T. suecica* es un excelente candidato como fuente de obtención. Uno de los compuestos bioactivos más destacables que pueden ser extraídos de la biomasa de esta microalga es la clorofila, que presenta interesantes aplicaciones como colorante natural con propiedades antioxidantes y antimutagénicas (Hosikian *et al.* 2010).

1.5 ANTIOXIDANTES Y LAS MICROALGAS

Los antioxidantes son moléculas capaces de neutralizar los radicales libres por medio de la donación de un electrón. Se ha demostrado que los antioxidantes, en pequeñas cantidades, pueden prevenir o retardar la oxidación de materiales fácilmente oxidables como los lípidos y otras moléculas (Chipault, 1962). En organismos aeróbicos, las especies reactivas al oxígeno (EROs) son esenciales para producir energía, detoxificación, señales químicas y función inmune (Aruoma, 1998).

Las microalgas son una excelente fuente de antioxidantes naturales (Hajimahmoodi *et al.* 2010). Durante el proceso fotosintético, las microalgas absorben la energía solar para convertirla en energía química que después se usará en la conversión del CO₂ a carbohidratos, generando al mismo tiempo oxígeno molecular, el cual puede alcanzar altas concentraciones (Rodríguez-García y Guill-Guerrero, 2008).

El oxígeno es fácilmente activado por la radiación ultravioleta o la luz solar produciendo especies reactivas del oxígeno (EROs) que incluyen aniones superóxido (O₂^{•-}), oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH[•]) (Sigaud-Kutner *et al.* 2005). Para evitar el posible efecto perjudicial de este tipo de compuestos las microalgas han desarrollado un mecanismo de protección que consiste en sintetizar compuestos y enzimas antioxidantes (Lu y Foo, 1995). Además, las microalgas sometidas a estrés inducido por las condiciones ambientales, desarrollan un proceso de defensa contra los radicales libres que consiste en mecanismos preventivos, mecanismo reparador, defensas físicas y defensas antioxidantes.

1.5.1 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA

Las defensas antioxidantes enzimáticas incluyen la súper-óxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa. Los antioxidantes no enzimáticos son representados principalmente por el ácido ascórbico (Vit. C), α -tocoferol (Vit. E), glutatión, carotenoides (Fig. 7), flavonoides y otros compuestos polifenólicos (Fig. 1.7, Valko *et al.* 2007).

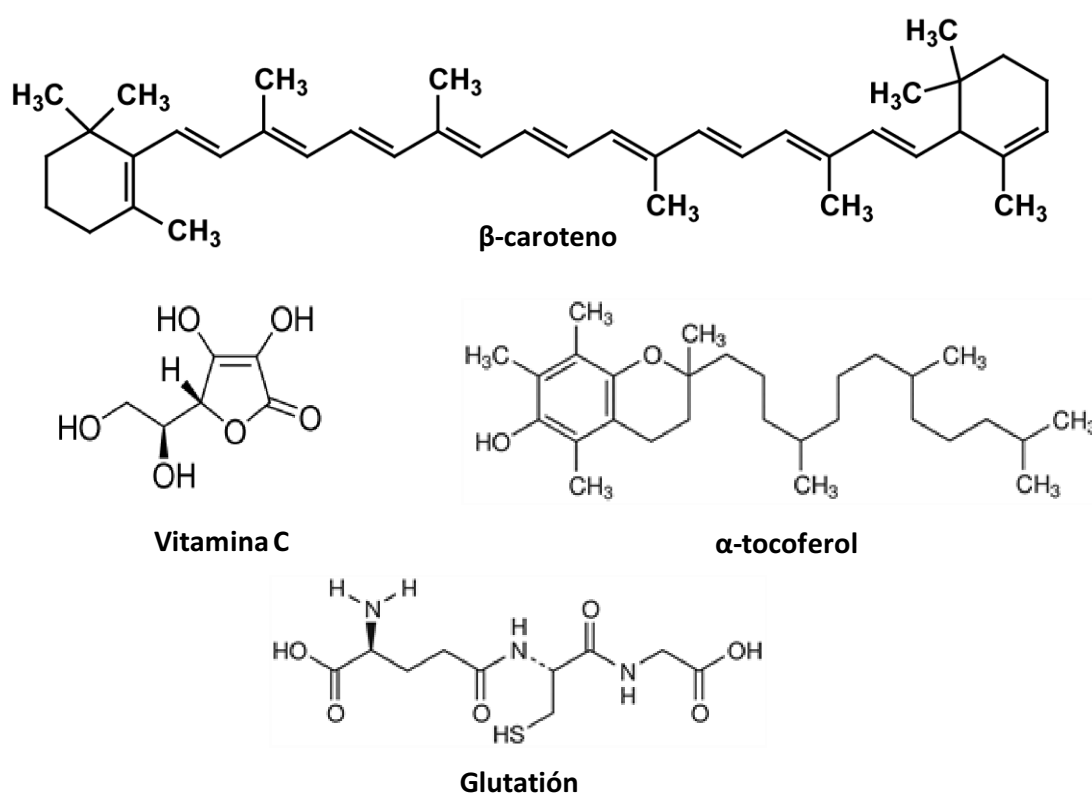
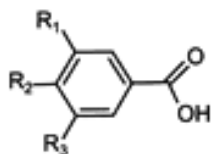


Figura 1.7. Estructura de antioxidantes no enzimáticos.

Las propiedades químicas de los polifenoles en términos de disponibilidad de los hidrógenos fenólicos, como hidrogeno-donantes inhibidores de radicales, predice su actividad antioxidante. Para que un polifenol sea definido como un antioxidante, éste debe satisfacer 2 condiciones básicas: 1) cuando en bajas concentraciones del sustrato pueda retrasar, retardar o prevenir la auto-oxidación o la oxidación mediada por el radical libre, 2) el radical resultante debe ser estable a través de enlaces de hidrógeno intramolecular en una oxidación posterior (Rice-Evans *et al.* 1996). La

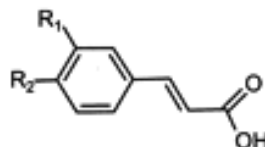
estructura de algunos de los principales grupos de polifenoles antioxidantes se muestra en la Fig. 1.8.

Ácidos hidroxibenzoicos



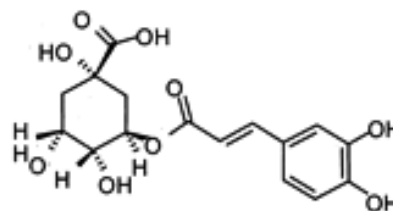
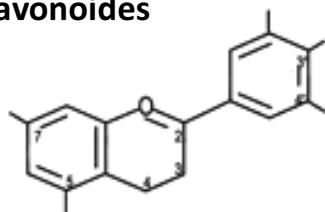
$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$: *ác. protocatéquico*
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: *ác. gálico*

Ácidos hidroxicinámicos



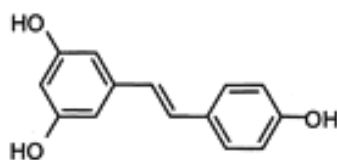
$R_1 = OH$: *ác. cumárico*
 $R_1 = R_2 = OH$: *ác. cafeico*
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: *ác. ferúlico*

Flavonoides



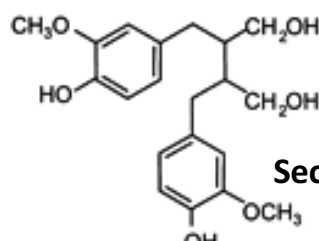
Ácido clorogénico

Estilbenos



Resveratrol

Lignanós



Secoisolariciresinol

Figura 1.8. Estructura de polifenoles (Manach *et al.* 2004).

Se han encontrado ácidos fenólicos en microalgas como el *Haematococcus pluvialis*, principalmente en forma de ácido gálico, además de carotenoides que tienen actividad antioxidante (Rodríguez-Meizoso *et al.* 2010). En extractos de la microalga *Spirulina platensis* se ha identificado una mezcla de β -caroteno, zeaxantina, astaxantina y cantaxantina, además de ficocianinas, clorofila *a* y algunos compuestos fenólicos, que son los principales responsables de la actividad

antioxidante de los extractos obtenidos a partir de esta microalga (Mendiola *et al.* 2005).

También en *Dunaliella tertiolecta* y en *Tetraselmis suecica* se demostró la producción de α -tocoferol, un compuesto al que se le atribuye una alta actividad antioxidante (Carballo-Cárdenas *et al.* 2003). En *Chlorella vulgaris* se ha encontrado feoforbide *a* y otros derivados de la clorofila, β -caroteno, luteína y feofitina *b*, además de compuestos hidrofílicos, a los que se les atribuye la alta actividad antioxidante que presenta el extracto de esta microalga (Cha *et al.* 2010).

1.5.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN MICROALGAS

Los métodos de extracción utilizados para obtener compuestos antioxidantes a partir de microalgas son diversos y se basan principalmente en la naturaleza de las moléculas deseadas. Así, factores tales como el tipo de disolvente a utilizar o los métodos de aislamiento y purificación van a tener una gran importancia en el proceso de extracción. De este modo, se han utilizado enzimas, principalmente carbohidrasas y proteasas, para romper la pared celular de microalgas como *Chlorella elipsoidea* y *Tetraselmis suecica*, logrando extraer los compuestos con actividad antioxidante intracelulares (Lee *et al.* 2009). Asimismo, se han utilizado disolventes con diferente polaridad, ya sea realizando una extracción secuencial o extracción en *batch* con compuestos como el hexano, acetato de etilo, etanol o metanol (estos dos últimos se pueden utilizar solos o mezclados con agua) para realizar extracciones secuenciales o en *batch* (Hajimahmoodi *et al.* 2010, Natrah *et al.* 2007, Li *et al.* 2007, Rodríguez-García y Guil-Guerrero 2008) o bien utilizando sólo agua, metanol o etanol con sonicación, baño de ultrasonido o disruptores para lograr la rotura celular y liberar el contenido intracelular (Abd El-Backy *et al.* 2009, Wang *et al.* 2010, Sigaud-Kutner *et al.* 2005, Matsukawa *et al.* 1997).

Existen métodos más sofisticados para preparar extractos de microalgas con objeto de investigar su actividad antioxidante e identificar los compuestos responsables de esa actividad. Entre ellos, se puede destacar la extracción con fluidos supercríticos. Así, Mendiola *et al.* (2005) aplicaron esta tecnología a la extracción de carotenoides, clorofila y compuestos fenólicos de *Spirulina platensis*. También es

relevante la extracción con agua subcrítica aplicada a *Haematococcus pluvialis*, donde el contenido de vitamina E estaba correlacionado con una alta actividad antioxidante de esta microalga (Rodríguez-Meizoso *et al.* 2010). Por otro lado, Cha *et al.* (2010) concluyeron que a una mayor temperatura de extracción se lograban mayores rendimientos de compuestos hidrofílicos y, por consiguiente de derivados de clorofila con actividad antioxidante.

En resumen, estos nuevos métodos hacen posible extracciones de metabolitos de interés más eficientes.

1.5.3 APLICACIONES

Como se ha mencionado anteriormente, unos de los productos de microalgas de mayor relevancia en la actualidad son los antioxidantes, por sus interesantes aplicaciones en el sector cosmético, alimentario y sanitario. El cultivo biotecnológico de microalgas, mediante la ingeniería del medio de cultivo y de las condiciones operacionales ha logrado incrementar la cantidad de antioxidantes y bioactividad de los mismos. La combinación de alta actividad antioxidante y el alto contenido nutricional ha conferido un alto valor en el mercado a algunas especies de microalgas (Natrah, 2007).

Algunos pigmentos y compuestos antioxidantes de *T. suecica* y *Ch. ellipsoidea* han sido utilizados en alimentos funcionales y en la preservación de alimentos (Lee *et al.* 2009; Guedes *et al.* 2011). En el área industrial, el α -tocoferol se usa en la preservación de alimentos, en cosméticos y protectores solares y como aditivo en alimentación animal para asegurar la salud del animal y mejorar la calidad de la carne (Carballo-Cárdenas *et al.* 2003).

1.6 EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA SALUD (ENFERMEDADES)

Las moléculas con actividad antioxidante como los polifenoles también presentan actividad antiviral contra el HIV, herpes simple, virus de la influenza y rinovirus, y adicionalmente pueden actuar como inhibidores de las células de carcinoma de mama (Rice-Evans *et al.* 1996). Los polifenoles son micronutrientes abundantes en nuestra dieta y en la actualidad se ha evidenciado su papel en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares. Se ha demostrado que estos efectos presentan una elevada dependencia de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad (Manach 2008).

Por otra parte, la vitamina E comprende un grupo de compuestos liposolubles, siendo el α -tocoferol el más abundante y con una alta actividad antioxidante *in vivo*. En la naturaleza, solo los organismos fotosintéticos son capaces de producir α -tocoferol y su principal función en la célula es la protección de las membranas contra el daño oxidativo. En los humanos se cree que el α -tocoferol juega un importante papel en la prevención de patologías de la piel y ojos, inducidas por la luz y desórdenes degenerativos como la arterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Carballo-Cárdenas *et al.* 2003). Además de la vitamina E, la luteína y la astaxantina se usan para prevenir o reducir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Además, se ha comprobado que la astaxantina posee actividad anti-inflamatoria y antitumoral mientras que la luteína se utiliza en el tratamiento de Alzheimer y en enfermedades relativas a la degeneración de la retina (Guedes *et al.* 2011).

Por último, Guedes *et al.* (2011) apuntaron que los ácidos grasos de cadena larga producidos a partir de microalgas inducían la lisis de protoplastos bacterianos. Del mismo modo, las ficocianinas, vitamina B12, ácidos fenólicos y tocoferoles aislados a partir de *S. platensis* parecen presentar actividad antitumoral y anticancerígena (Oh *et al.* 2011). Asimismo se ha demostrado que extractos ricos en flavonoides de *Chlorella vulgaris* reducen la migración de células tumorales, lo que conlleva una inhibición de la metástasis (Wang *et al.* 2010).

1.7 SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS EN *T. SUECICA*

El proceso de *downstream* es definido como una secuencia de procedimientos que parten de un caldo de cultivo y resultan en un producto purificado, que puede ser comercializado. La extracción mediante sistemas bifásicos acuosos (ATPS por sus siglas en inglés) es uno de los procedimientos que han sido propuestos en los últimos años (Marini *et al.* 2011) para la obtención de diversidad de metabolitos y moléculas de interés industrial.

El creciente interés en el desarrollo de procesos de extracción más eficientes y respetuosos con el medio ambiente ha promovido el uso de este tipo de métodos de separación (Ulloa *et al.* 2011a). Esta técnica fue introducida por primera vez por Beijernick en 1896 y fue desarrollada originariamente para la purificación de compuestos químicos, aunque existen aplicaciones orientadas a la separación celular (Tsukamoto *et al.* 2009). Albertson, que investigó la aplicación de estos sistemas para la separación de células y macromoléculas, encontró que algunos polímeros y electrolitos forman un sistema de dos fases a una concentración definida (Mokhtarani *et al.* 2009). Los ATPS se forman por la adición de dos (o más) polímeros solubles en agua o un polímero simple y una sal específica, dando lugar a dos fases acuosas inmiscibles por encima de ciertas concentraciones críticas o temperatura. Estos sistemas comprenden una fracción másica de agua del 80-90% en fases en equilibrio, conteniendo cada fase principalmente uno de los compuestos y una pequeña cantidad del otro (Deng *et al.* 2007).

Los ATPS son un método simple, económico, altamente eficiente y versátil, ya que los solutos que se pueden separar entre las fases son de tamaño variado como

iones inorgánicos, pequeñas moléculas orgánicas y macromoléculas biológicas, así como también las partículas coloidales de partículas inorgánicas, virus y células (Ferreira *et al.* 2011). En la figura 1.9 se muestran los ATPS formados con sal+surfactante+agua donde se definen las fases y cómo se distribuyen los estándares y el contenido intracelular de *T. suecica* en cada una de ellas. También son apropiados para la extracción de proteínas, enzimas y biomoléculas a partir del caldo de cultivo (Mokhtarani *et al.* 2011).

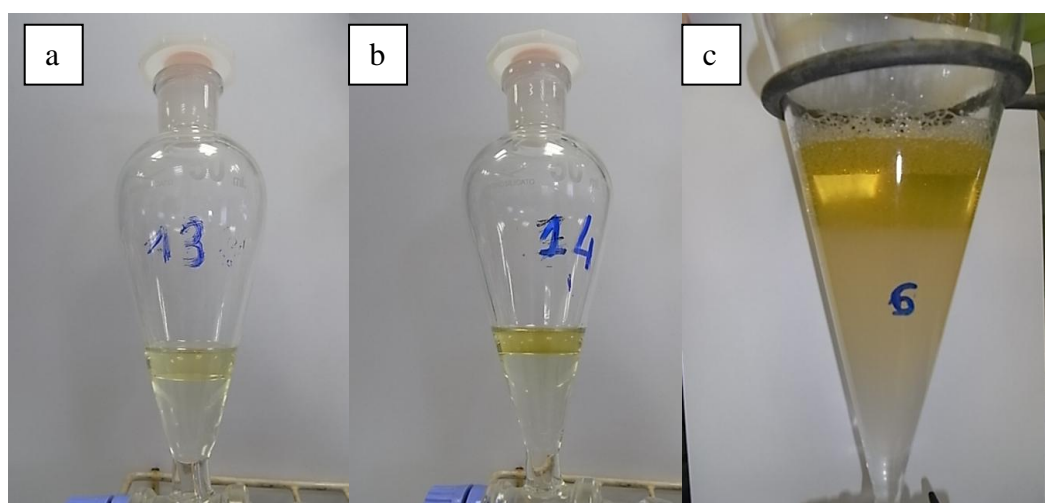


Figura 1.9. ATPS formados con sal+surfactante+agua (a) donde se definen las fases y como se distribuyen los estándares (b) y el contenido intracelular de *T. suecica* (c) en cada una de ellas

Las ventajas de los sistemas ATPS se pueden resumir en las siguientes: alto contenido de agua en ambas fases (70 a 80% w/w), alta compatibilidad y baja tensión superficial, baja degradación de las biomoléculas, buena resolución y alto rendimiento de separación, alta capacidad relativa, fácil escalado, bajo coste de materiales y la posibilidad de reciclar el polímero y la sal (Mokhtarani *et al.* 2011). Los ATPS más comunes son los contruidos con polietilenglico (PEG)-dextrano o PED-sal (Salabat *et al.* 2010) aunque en la actualidad, líquidos iónicos o agentes tenso-activos también han sido investigados (Ulloa *et al.* 2011a)

En este caso, el sistema ATPS basado en un surfactante posee ventajas sobre los que usan líquidos iónicos u otros polímeros, como una interface con baja tensión, bajo coste, se requieren bajas cantidades de sal inorgánica para inducir la separación de fases, nula inflamabilidad, todos los componentes están disponibles

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CULTIVO

En este trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de magnesio, silicio y estroncio en concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 3 y 10 mM de forma independiente sobre la composición bioquímica, productividad (definida como la cantidad de biomasa producida por unidad de volumen y unidad de tiempo, expresado en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$) y actividad antioxidante de *Tetraselmis suecica* en cultivo semicontinuo a escala laboratorio con una tasa de renovación del 40%. Se analizará la productividad según el escalado del cultivo y se aplicarán sistemas acuosos bifásicos (ATPS por sus siglas en inglés) para la extracción y semi-purificación de los compuestos con actividad antioxidante. Finalmente, se ensayará el efecto de los extractos de esta microalga en líneas celulares cancerígenas de próstata.

2.1.1 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo control utilizado es agua de mar con salinidad del 3.5%, medida con un refractómetro manual marca Atago S/Mill. El agua se esteriliza a 15 lb/pulg² durante 20 min; una vez frío se le agrega la solución estéril de nutrientes denominada “algal”. Esta solución contiene macroelementos como NaNO_3 4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ y oligoelementos: ZnCl_2 , 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; MnCl_2 , 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Na_2MoO_4 , 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; CoCl_3 , 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; CuSO_4 , 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; citrato férrico, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; tiamina, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; biotina, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; cianocobalamina, 6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; EDTA, 52,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fábregas *et al.*, 1985).

Al medio de cultivo control se le añadieron separadamente las solución autoclavada de magnesio ($\text{MgCl}_2\cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), silicio ($\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) y estroncio ($\text{SrCl}_2\cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) en concentraciones finales de 0.01, 0.1, 1, 3 y 10 mM para cada

oligoelemento a evaluar en el cultivo de la microalga, tal como se muestra en la Tabla 2.1. También se evaluó el efecto de la adición simultánea de Mg y Sr en concentración de 3 y 0.1 mM respectivamente.

Tabla 2.1. Tratamientos con Mg, Si y Sr para el cultivo de *T. suecica* en concentración expresada en milimoles por litro (mM).

| Oligoelemento | Concentración (mM) | Componentes del medio de cultivo |
|---------------|--------------------|-----------------------------------|
| Control | 0 | Agua de mar + algal |
| Magnesio | 0.01 | Agua de mar + algal con 0.01 mM |
| | 0.1 | Agua de mar + algal con 0.1 mM |
| | 1 | Agua de mar + algal con 1 mM Mg |
| | 3 | Agua de mar + algal con 3 mM M |
| | 10 | Agua de mar + algal con 10 mM Mg |
| Silicio | 0.01 | Agua de mar + algal con 0.01 mM |
| | 0.1 | Agua de mar + algal con 0.1 mM Si |
| | 1 | Agua de mar + algal con 1 mM Si |
| | 3 | Agua de mar + algal con 3 mM Si |
| | 10 | Agua de mar + algal con 10 mM Si |
| Estroncio | 0.01 | Agua de mar + algal con 0.01 mM |
| | 0.1 | Agua de mar + algal con 0.1 mM Sr |
| | 1 | Agua de mar + algal con 1 mM Sr |
| | 3 | Agua de mar + algal con 3 mM Sr |
| | 10 | Agua de mar + algal con 10 mM Sr |

2.1.2 CULTIVO EN REACTOR DE 80 ML

Se inoculó la microalga marina *T. suecica* con una densidad inicial de 2.7×10^6 cel·mL⁻¹ en mini fotorreactores tubulares de vidrio para cultivo marca Trymex de 30 mm de diámetro y fondo cóncavo con 80 ml de medio (Otero y Fábregas, 1997). Los tubos se colocaron en un soporte con las lámparas de luz integradas (Philips TLD 36 W/54) que proporcionaban una intensidad luminosa de 220 $\mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 2.1), medida con un luxómetro Neurtext HD8366. Para la conversión de lux a $\mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se utilizó el factor de conversión propuesto por Ginzburg (1987). Los cultivos se sometieron a un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se incubaron en una cámara de cultivo a una temperatura de

20°C, con un flujo de aire de 100 ml·min⁻¹ enriquecido con un pulso de 10 s de CO₂ cada 10 minutos.

La renovación del cultivo se realizó durante la primera hora de luz con agua de mar estéril enriquecida con los mismos nutrientes a la concentración inicial, hasta concluir con la recolección de biomasa, la cual se inició una vez que el cultivo estaba estabilizado; eso se estima al tener una renovación de 2 veces el volumen de cultivo (Fábregas *et al.* 1996), manteniéndose la densidad celular con poca variación (dentro del 10%) durante 30-45 días.



Figura 2.1. Biorreactores de 80 ml con *T. suecica* en el medio de cultivo enriquecido con oligoelementos en soportes para la adecuada incidencia de luz.

El sistema CO₂ - H₂CO₃ - HCO₃⁻ - CO₃⁻² es el tampón más importante presente en el agua y es el mejor medio disponible para el control y mantenimiento del nivel de pH óptimo para el cultivo masivo de microalgas (Richmond, 2004). Para ésta microalga marina, el pH se mantuvo en un rango entre 7 y 8, controlado con el flujo directo de CO₂ a la línea de aireación, de acuerdo con la actividad celular.

Se cultivó la microalga *T. suecica* en medio de cultivo “algal” con 5 concentraciones diferentes de magnesio, silicio y estroncio tal como se indica en la Tabla 2.1, con 3 réplicas para cada condición de cultivo.

2.1.3 CULTIVOS EN REACTORES DE 80 mL, 5 L Y 80 L

La microalga *T. suecica* se cultivó en 2 condiciones diferentes: 1) medio de cultivo control y 2) medio de cultivo control + Sr (10 mM). Los cultivos se llevaron a cabo en reactores con diferente volumen (Fig. 2.2): reactor de tubo de vidrio de 80 ml de volumen de operación, reactor en botellón de 5 L de volumen de operación y

reactor prismático de metacrilato de 80 L de volumen de operación con dimensiones de 150 x 60 x 10 cm. En éste último solo se realizó el cultivo en el medio control ya que el medio con estroncio formó una película en la superficie del sensor de pH y en el canal de aireación, evitando el funcionamiento apropiado de ambos.

La esterilización de los reactores de 80 mL y 5 L se realizó en autoclave a 15 lb pulg⁻² durante 20 min. El reactor de 80 L se esterilizó químicamente, adicionando una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% con un tiempo de contacto de 24 h. Posteriormente se adicionó aire durante 2 h y se agregó tiosulfato de sodio (hasta 0.1%) para la eliminación de cloro. Finalmente se lavó 2 veces con agua destilada estéril, y se rellenó con agua de mar estéril enriquecida con nutrientes.

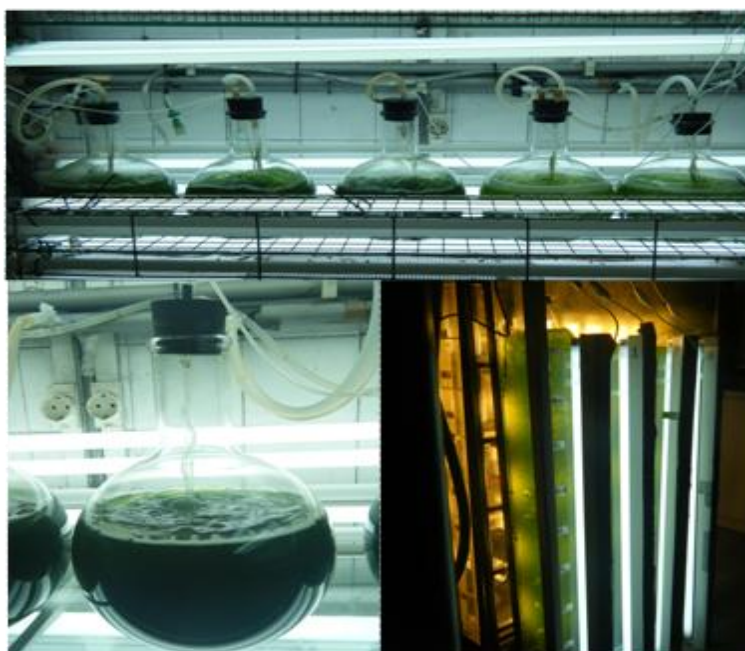


Figura 2.2. Biorreactores de 5 L y 80 L para el cultivo de *T. suecica* en medio de cultivo control y medio de cultivo con Sr (10 mM)

Los biorreactores fueron inoculados con una densidad celular de 2×10^6 cel·mL⁻¹ en cultivo semicontinuo con una tasa de renovación del 40% en régimen de ciclostato con periodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (Otero and Fábregas 1997) y una intensidad luminosa de $220 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($1.09 \times 10^{-8} \mu\text{mol quanta}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), $450 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($1.09 \times 10^{-8} \mu\text{mol quanta}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) y $596 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($5.17 \times 10^{-8} \mu\text{mol quanta}\cdot\text{cel}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), respectivamente para cada reactor.

La temperatura se mantuvo a 20°C y la agitación se logró por medio del flujo de aire que fue enriquecido con CO₂ durante el período de luz para mantener el pH en un rango entre 7 y 8. Los cultivos se mantuvieron en un régimen semicontinuo durante 30 días.

2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.2.1 RECUPERACIÓN DE BIOMASA

Una vez alcanzada la fase de estabilización del cultivo, donde la densidad celular permanece con una concentración estable, con una variación no mayor al 10% durante la renovación del medio, se recogió diariamente un volumen de muestra equivalente al 40% del volumen del cultivo, se centrifugó a 3900g durante 10 min y se congeló a -20°C para los análisis que así lo requerían y otras muestras se liofilizaron. La biomasa se utilizó posteriormente para hacer los análisis de composición bioquímica, peso seco, concentración celular, análisis de oligoelementos y actividad antioxidante.

2.2.2 CONCENTRACIÓN CELULAR

La concentración celular se midió diariamente en muestras frescas tomadas en la primera hora de luz, por el método de conteo directo al microscopio óptico (NIKON 218263) en cámara Improved Neubauer, realizando las diluciones necesarias para lograr un conteo de entre 30 y 300 células por campo “L” mostrado en la Fig 2.3.

2.2.3 PESO SECO

Para la determinación de peso seco se requiere de la separación de las células por membranas de filtración; para ello se utilizaron filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C a secado hasta peso constante (80°C durante 12 horas). Una vez estabilizados, se pesaron en una balanza analítica de alta precisión (Sartorius modelo 2405 con precisión de ± 0.001 mg); una vez registrado el peso del filtro, se filtraron 3

ml de cada muestra de cultivo, haciendo 5 lavados con 3 ml de formiato de amonio 0.5 M (Zhu y Lee 1997), Posteriormente, se secaron en un horno a 80°C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron. La diferencia entre el peso del filtro más la muestra menos el peso del papel nos da el peso seco.

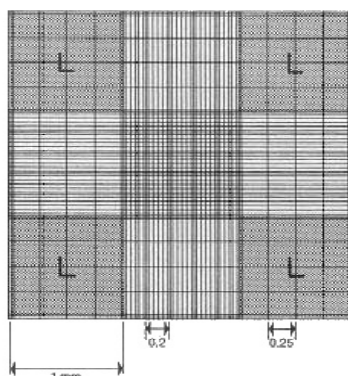


Figura 2.3. Imagen de distribución de una cámara de Neubauer.

2.2.4 CENIZAS

Para la determinación de cenizas se filtraron 15 ml de muestra fresca en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 47 mm de diámetro previamente pesados (calcinados a 550°C durante 30 min) con 3 lavados con formiato de amonio 0.5 M. Una vez filtradas las muestras, se calcinaron en una mufla a 550°C durante 24 horas, se dejaron enfriar y se pesaron. Las diferencias de pesos representan la cantidad de cenizas presentes en las muestras.

2.2.5 PROTEÍNAS

Se utilizó el método de Lowry modificado por Herbert *et al.* (1971); para la determinación se preparó una curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) disuelta en NaOH 1 N, en un rango de concentraciones entre 25 y 400 µg/ml. La concentración que tienen las muestras se determina por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón (Figura 2.4).

Se centrifugaron 5 ml de cultivo fresco a 3100 rpm durante 10 min en tubos de rosca; en este caso se determinó este volumen de acuerdo a la densidad celular que presentaba el cultivo, de forma que la muestra entrara en el rango de la curva

patrón. Se añadieron 2 ml de NaOH 1N y se metieron las muestras al baño maría a 95 – 100°C durante 1 hora, se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 15 min y se centrifugaron a 3900g durante 10 min en una centrífuga (PACISA KS-8000). Se transfirieron 0.1 ml del sobrenadante a un tubo de ensayo (por triplicado) y se añadieron 0.4 ml de H₂O destilada y 0.3 ml de NaOH 1N y se agitaron en un vórtex.

Se preparó una solución de Na₂CO₃ al 5% y se mezcló en proporción 1:1 con una solución de tartrato de sodio y potasio al 1% con CuSO₄ · 5 H₂O al 0,5% en peso. Ésta mezcla se realizó justo antes del análisis y se añadieron 2 ml a cada una de las muestras a analizar, tanto a la curva patrón como al blanco y se agitó inmediatamente para homogenizar. Después de 10 min se añadieron 0.4 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1 en agua destilada) y se agitaron inmediatamente en un vórtex. Se dejaron en reposo durante 30 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro HP 8453 E-DA a 750 nm en cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico.

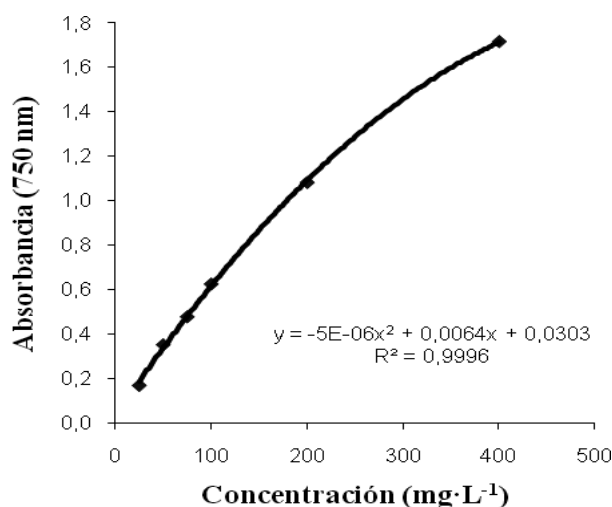


Figura 2.4. Curva de calibrado de seroalbúmina bovina en NaOH 1 N utilizada para determinar el contenido de proteína en *T. suecica*.

2.2.6 CARBOHIDRATOS

Se tomaron 5 ml de cultivo fresco, centrifugado a 3900g durante 10 min (posteriormente congelados), se resuspendieron en 4 ml de NaOH 1N y se agitaron en el vórtex y se sonicaron en un Cole Parmer 4710, durante 30 segundos en frío o hasta ruptura celular. Se repartió en 3 tubos con 0.5 ml de muestra por tubo y se añadió 0.5 ml. de NaOH 1N. Se preparó la curva patrón a partir de una solución

madre de glucosa con una concentración de 1 mg/ml en NaOH 1 N. Se hizo una dilución 1:10 de la solución madre y se hicieron diluciones para tener un rango de concentración entre 20 y 100 µg/ml, todas las diluciones se hicieron en NaOH 1 N (Figura 2.5). Se añadieron tubo por tubo 25 µl de fenol al 80%, se agitó en el vórtex e inmediatamente se añadieron 2.5 ml de H₂SO₄ concentrado agitando en el vórtex de nuevo. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro HP 8453 E-DA en cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico a 485 nm contra el blanco antes de 2 h (Dubois 1956; Kochert 1978).

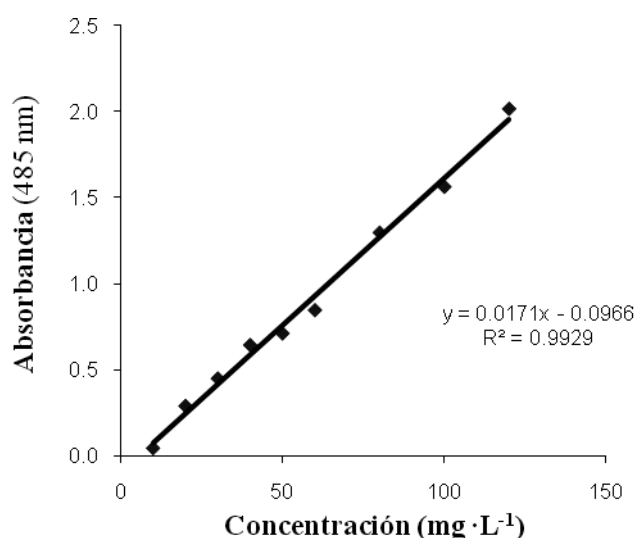


Figura 2.5. Curva de calibrado de glucosa en NaOH 1 N utilizada para determinar el contenido de carbohidratos en *T. suecica*.

2.2.7 LÍPIDOS

Se preparó una curva patrón a partir de una solución de tripalmitina en cloroformo con una concentración de 4.5 mg en 15 ml; se hacen diluciones de tal forma que se tenga un rango de concentraciones de entre 0.03 y 0.27 mg/ml (Figura 2.6).

La extracción de lípidos se realizó según Bligh y Dyer (1959); primeramente se centrifugaron 10 ml de cultivo (3000 g durante 10 min) y se retiró el sobrenadante, se adicionó al sedimento 3 ml de metanol + 1.5 ml de cloroformo, se sonicó durante 2 min en baño de hielo y se agitó durante 30 s, protegiendo de la luz. Se dejó 20 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 3900 g durante 10 min y se recogió el sobrenadante. Se adicionaron al sobrenadante 1.5 ml de cloroformo y 1.5 ml de agua destilada y se agitaron hasta obtener una solución homogénea y densa. Se centrifugó 5 minutos a 3900 g y se retiró la fase superior acuosa con una pipeta Pasteur, se añadió 0.5 ml de acetona para ayudar a eliminar las trazas de agua y se evaporó la

fase orgánica a una temperatura inferior a 37°C durante 24 horas o al vacío. También se evaporaron las muestras correspondientes a la curva estándar, se re-suspendieron en 1 ml de cloroformo y se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Para la determinación espectrofotométrica de lípidos se utilizó el método de carbonización simple propuesta por Marsh y Weinstein (1966), la cual consiste en repartir 200 µl de la muestra resuspendida en cloroformo (por triplicado), se evaporaron y se adicionaron 2 ml de H₂SO₄ concentrado a cada tubo de la curva patrón y muestras, que a partir de aquí siguen el mismo procedimiento. Se puso un blanco con 2 ml de H₂SO₄ y se calentó a 200°C durante 15 min (la temperatura dentro de los tubos no debe variar más de 2°C durante el período de carbonización, cuidando de no poner tubos en el centro de la gradilla para permitir una difusión homogénea del calor). Se dejaron enfriar los tubos en refrigeración durante 5 min y se añadieron 3 ml de agua destilada a cada tubo, se mezclaron bien y se volvieron a refrigerar hasta que se enfriaron o desaparecieron las burbujas. Se midió la absorbancia a 375 nm en un espectrofotómetro HP 8453 E-DA, haciendo la lectura antes de 2 h, dado que en los tubos que contienen más de 160 µg de lípidos se produce con frecuencia floculación de partículas de carbón una vez transcurrido este tiempo.

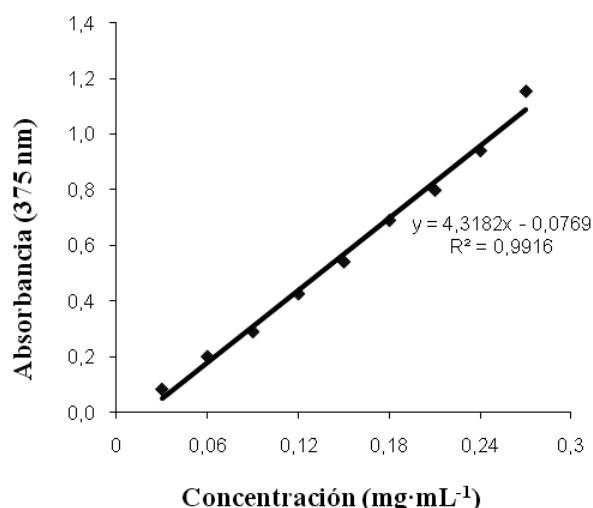


Figura 2.6. Curva de calibrado de tripalmitina en cloroformo utilizada para determinar el contenido de lípidos en *T. suecica*.

2.2.8 ÁCIDOS GRASOS

Para la determinación de ácidos grasos se utilizó el método de extracción de lípidos propuesto por Bligh y Dyer (1959), el cual consiste en centrifugar 10 ml de medio de cultivo fresco a 3900 g durante 10 min, agregar 3 ml de

cloroformo:metanol ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) 1:2, se taparon los tubos en oscuridad, se agitan, y se sonicar 30 s, se dejan reposar durante 15 min, se centrifugaron 10 min y en caso de que el pellet no esté totalmente blanco se vuelven a sonicar 30 s más. Una vez centrifugado, se separa la fase cloroformo-metanol y se pasó a otro tubo de centrífuga en hielo, se añadieron 1.8 ml de CHCl_3 y 1.8 ml de H_2O destilada y se centrifugan 2 min a 3900 g; se retiró el agua de la fase superior con una pipeta Pasteur y se desechó, se recuperó la fase clorofórmica (fase inferior), se colocó en otro tubo con tapón de teflón y se añadieron 50 μl de estándar interno con jeringuilla (17:0 ác. Heptadecanoico que no existe en la naturaleza) y 3 gotas de metanol para retirar el agua que haya quedado; se selló la rosca de los tubos con teflón y se colocaron en baño a 35-40° C. Se evaporó el disolvente hasta sequedad bajo flujo de N_2 .

La metanólisis se realizó (Sato y Murata, 1988) añadiendo 2 ml de HCl (5%): CH_3OH (p/p). Se colocaron en baño maría a 85° C durante 2 horas y media (bien tapados) y se enfriaron en hielo o en la nevera, se añadió 1 ml de hexano y se agitó para extraer los ácidos grasos. Se retiró la fase superior (hexano) a un tubo; se agrega nuevamente 1 ml de hexano, se agitó y se retiró la fase superior al mismo tubo. Se secó con N_2 , se añadió 100 μl de hexano ultrapuro GC-MS(H-2) y se colocaron en viales. Las muestras listas se guardaron en el congelador a -20°C, no más de 2 semanas, hasta ser analizados en un cromatógrafo de gases acoplado con espectrómetro de masas (Fisons Instruments MD800) usando una columna Omegawax 250 (Supelco Inc.).

Para el análisis se inyectó un volumen de muestra de 1 μl ; el gas portador fue Helio con un flujo en la columna de 0.8 ml min^{-1} , con un split de 1.99 y la temperatura del inyector de 230°C. El método cromatográfico tuvo un tiempo de splitless de 1 min y un rango de temperatura de 1 min a 35°C, rampa de 35°C min^{-1} hasta 200°C y 45 min a 200°C. El método de adquisición de espectros de masas tuvo un tiempo de retardo del solvente de 4.5 min, un rango de masas de 10 a 400 y tiempo de interscan de 30 s. La identificación de ácidos grasos se hizo por comparación de los espectros de masas con espectros contenidos en las bases de datos NIST y WILEY.

2.2.9 ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA

El análisis de oligoelementos se realizó por la técnica de ICP-MS, que es una técnica espectroscópica para el análisis de elementos que da lugar a medidas rápidas, exactas y precisas.

Consiste en un análisis de plasma de acoplamiento inductivo y de una fuente de ionización a presión atmosférica donde la muestra que llega es atomizada e ionizada. Los iones formados pasan al espectrómetro de masas donde se separan en función de su relación carga/masa. Cada una de las masas que llega al detector es analizada para determinar su abundancia en la muestra.

Se utilizaron 0.5 g de biomasa liofilizada de microalga que fue introducida en un vaso de reacción y se añadieron 8 ml de HNO_3 y 2 ml de H_2O_2 , se dejó reaccionar unos minutos, se desprendió una capa de vapor y posteriormente se tapó el vaso de reacción. La mezcla se calentó levemente hasta 200°C para permitir que los gases de reacción se esparcieran por toda la pared del vaso y se mantuvo la temperatura durante 10 min. Posteriormente se lavó el vaso con ácido nítrico diluido para prevenir la precipitación de las sales de la muestra.

2.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los ensayos que se usan para medir la actividad antioxidante normalmente se basan en las reacciones de las sustancias con poder antioxidante evitando la acción del oxígeno, para detener la formación de radicales y/o impedir la ruptura de hidroperóxidos. La actividad de los antioxidantes naturales depende del ensayo utilizado, por lo que se pueden obtener valores muy distintos de capacidad antioxidantes. La evaluación de la actividad antioxidante por el método del DPPH se seleccionó principalmente por ser un método rápido, simple y sensible, siendo ampliamente utilizado como técnica de preselección (Chinnici *et al.* 2004).

2.3.1 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se prepararon los extractos, triturando las muestras en un mortero hasta obtener un polvo fino. Por cada 30 mg se añade 1 ml de los diferentes solventes utilizados para la extracción; agua, metanol:agua (1:1), metanol y etanol (todos los disolventes fueron suministrados por Panreac, Barcelona, España). Las mezclas se agitaron en un vórtex durante 30 s y se pusieron en un baño de ultrasonidos (Elmasonic S40H, Germany) con hielo durante 45 min. Las mezclas se centrifugaron (Sigma laborzentrifugen, Germany) a 3960 g durante 10 min y el sobrenadante se recogió y pasó a través de un filtro Millex GN filter (Millipore, USA) con poro de 0.45µm.

2.3.2 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Los fenoles totales se estiman colorimétricamente por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Los grupos hidroxilos de los polifenoles del extracto reaccionan con el reactivo químico desarrollando la coloración azul.

Se tomaron 500 µl de cada extracto, se añaden 2.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (1/10 en agua destilada) y entre 30 s y 8 min después se añaden 2 ml de carbonato sódico (7.5%) se mezcla bien y se deja una hora a temperatura ambiente. Luego se lee la absorbancia a 765 nm y se compara con una curva de calibrado de ácido gálico (Fig. 2.7). El contenido de polifenoles totales se expresa como partes por millón (ppm) equivalentes de ácido gálico.

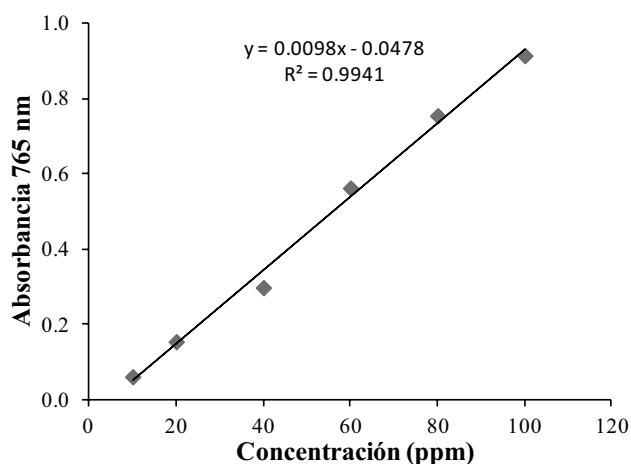


Figura 2.7. Curva de calibración de ácido gálico, utilizada para determinar los polifenoles del extracto metanólico de *T. suecica*.

2.3.3 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS EXTRACTOS DE *T. SUECICA*.

La identificación de compuestos fenólicos se realizó en un sistema HPLC que consta de una bomba HPLC JASCO PU-980 equipada con una unidad de gradiente cuaternario JASCO LG-1580-04, degasificador Degasys populaire Uniflows o., LTD, detector UV-VIS de longitud de onda variable JASCO UV-1575 y control de temperatura de columna JONES Chromatography 7971.

El sistema fue monitorizado y controlado por el software Biocrom 2000, versión 3. Los compuestos fenólicos de los extractos se detectaron a 280 nm y la separación de éstos se realiza en una columna Kromasyl 100 C₁₈, 5 µm (15 x 0,4 cm i.d.; Teknokroma, Barcelona, Spain).

Se empleó un gradiente binario de elución con una fase móvil consistente en metanol HPLC (Fase móvil A) y agua milliQ acidificada con ácido acético al 0,5% (Fase móvil B) y fue el siguiente: 5%A y 95% B y se mantuvo isocráticamente hasta

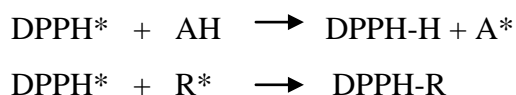
50 min. El flujo de la fase móvil fue de $0,7 \text{ ml min}^{-1}$ y el volumen de inyección fue de $20 \text{ }\mu\text{L}$.

El equipo utilizado para análisis de espectrometría de masas mediante electrospray, en campo positivo, fue un HP-serie 1100-MSD. Las condiciones fueron: flujo de gas de secado (nitrógeno): 13 L min^{-1} , presión del nebulizador: 40 psi, temperatura del gas: 350°C (Rubilar *et al.* 2007). Los espectros se analizaron mediante el Software HP ChemStation computer program.

2.3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIRRADICAL

A) DPPH

Uno de los métodos para medir la actividad antirradical fue el método del DPPH (Brand-Williams *et al.* 1995) con modificaciones menores. El DPPH (2,2-difenil-picrilhidracilo) es un radical estable que en disolución metanólica, posee absorbancia a 515 nm . Cuando la solución de DPPH se pone en contacto con un antioxidante (AH) o con un radical (R^*) la absorbancia va disminuyendo según se elimina de la disolución el radical DPPH^* , de acuerdo con las siguientes reacciones:



El método consiste en preparar una disolución de DPPH en metanol a una concentración de $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ que se guardó en frasco ámbar a 4°C . En una cubeta de cuarzo se añaden $980 \text{ }\mu\text{L}$ de disolución de DPPH y posteriormente se añadieron $20 \text{ }\mu\text{L}$ del extracto de la microalga y se agitó. Se introdujo la cubeta en un espectrofotómetro Jasco V-530 UV/VIS y se midió la absorbancia a 515 nm hasta la estabilización de la reacción. Para el blanco se utilizó metanol. Así mismo, se utilizó como control una alícuota de DPPH.

B) TEAC

El método para medir la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC por sus siglas en inglés) fue propuesta por Re *et al.* (1999) y se basa en el barrido de radicales ABTS (2, 2'-azinobis, 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate) (Fluka, Germany). El radical catiónico ABTS (ABTS^+) se produce por la reacción de una solución stock 7 mM de ABTS con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio

(Sigma, St. Louis, Mo, USA). La mezcla se dejó reposar en la oscuridad durante 12-16 h antes de usarla, después fue diluida con tampón salino de fosfato (PBS) pH=7.4 hasta una absorbancia de 0.7 medida a 734 nm y equilibrada a 30°C. Posteriormente, a 1 ml de solución de ABTS diluida se le agregaron 10 µl del extracto de microalga. Las lecturas de la absorbancia se tomaron a intervalos de 1 min hasta 6 min; se utilizó el blanco reactivo en cada ensayo. La inhibición de la absorbancia a 734 nm se calculó en función de la concentración de extractos y se expresa como mM Trolox, para lo cual se construyó una curva de calibración en un rango de 0-2 mM de Trolox (Fig. 2.8).

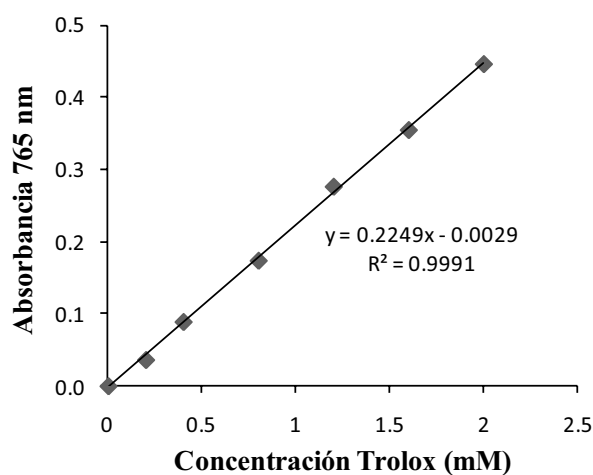


Figura 2.8. Curva de calibración de Trolox utilizada para medir la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) de los extractos de la microalga *T. suecica*.

C) FRAP

La medida del poder antioxidante en la reducción del hierro (FRAP, por sus siglas en inglés) se basó en el método propuesto por Benzie and Strain (1996) la solución stock incluía 30 mM de tampón de acetato (pH 3.6). 10 mM de 2,4,6-tripiridyl-*s*-triazine (TPTZ) (Fluka, Steinheim, Alemania) en una solución 40 mM de HCl y 20 mM de FeCl₃·6H₂O. La solución de trabajo se preparó mezclando 25 ml de tampón acetato, 2.5 ml de solución TPTZ y 2.5 ml de solución de FeCl₃·6H₂O. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min y a ésta se conoce como la solución FRAP. 100 µl de muestra se mezclaron con 3 ml de solución FRAP y la mezcla se mantuvo durante 6 min en la oscuridad a temperatura ambiente. El reactivo se preparó siempre fresco y fue usado como blanco. La absorbancia fue monitorizada a 593 nm. La actividad se expresó como mmol FeSO₄·7H₂O por gramo de biomasa seca; para ello

se construyó una curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en un rango de 0.1 – 0.8 mM (Fig. 2.9).

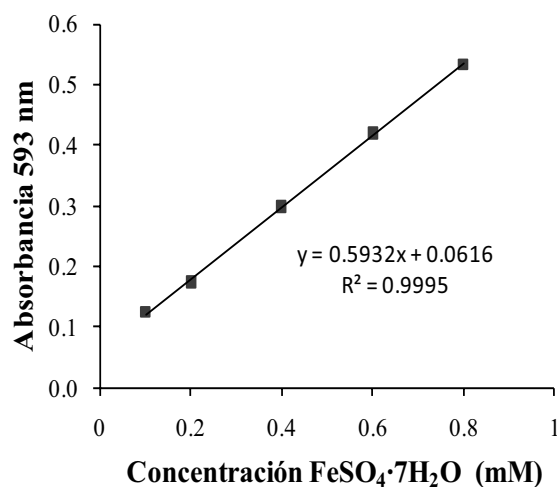


Figura 2.9. Curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para la determinación del poder antioxidante en la reducción del hierro (FRAP) de los extractos de la microalga *T. suecica*.

2.3.5 EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

A) TBARS

Para el análisis de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés), se preparó el liposoma como describen Miyake *et al.* (1997). Brevemente, 0.1 g de fosfatidilcolina (α -lecitina) (Sigma, St. Louis, Mo, USA) se emulsionó con 10 ml de solución 3.4 mM de tampón de fosfatos (pH 7.4) usando un sonicador UP200s (con ciclo 0.5 y amplitud de 60%) (dr. Hielscher, Teltow, Germany); éste reactivo fue preparado siempre fresco.

Se utilizó 1 ml de la emulsión de lecitina para el análisis, donde 1 ml de tampón de fosfato fue el blanco reactivo. Se preparó una solución con la mezcla de ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico y ácido clorhídrico (TCA-TBA-HCl) en una proporción 15%-0.375%-0.25N de acuerdo a lo propuesto por Buege y Aust (1978).

Se dispusieron 100 μl de cada muestra (extracto) o agua destilada (blanco de la muestra) un tubo de ensayo. La peroxidación se inicia al adicionar 100 μl de una solución 100 μM de cloruro férrico, tal como recomiendan Aruoma *et al.* (1993); después se adicionó a cada tubo 2 ml de la mezcla de TCA-TBA-HCl. Se dejó reaccionar a 50°C durante 24 h (las muestras y la curva de calibración). Una vez

transcurrido ese tiempo, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se filtraron a través de cartuchos Millipore de 0.45µm de tamaño de poro; después se midió la absorbancia a 535 nm en un espectrofotómetro Jasco V-530 UV/VIS. Se preparó una curva de calibración con malondialdehído (MDA) en un rango de 10 a 500µM (Fig. 2.10) y los resultados se expresaron como equivalentes de MDA.

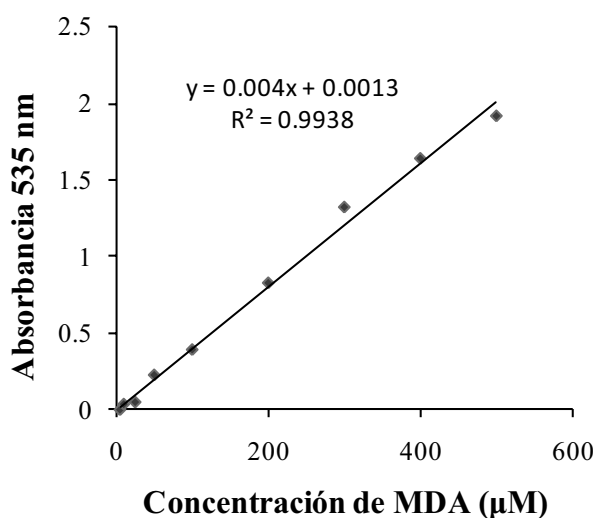


Figura 2.10. Curva de calibración de MDA utilizada para determinar la actividad de protección de la oxidación lipídica de los extractos de *T. suecica*.

B) BLANQUEAMIENTO DEL β -CAROTENO

El método del blanqueamiento del β -caroteno fue propuesto por Miller (1971). El blanqueamiento oxidativo del β -caroteno fue medido en una emulsión de β -caroteno y ácido linoleico usando el siguiente procedimiento: se preparó una solución con 2 mg de β -caroteno en 10 ml de cloroformo, 1 ml de ésta solución se pasó a un matraz que contenía 20 mg de ácido linoleico purificado y 200 mg de Tween 40. Después el cloroformo se evaporó en un rotavapor. Se añadieron 50 ml de agua destilada oxigenada (se puso en agitación magnética durante 1 hora) al matraz, agitando vigorosamente y se pipetearon 5 ml de alícuotas de la emulsión formada en tubos que contenían 0.2 ml de cada uno de los extractos de microalgas.

Los tubos de las muestras y el control se taparon y se pusieron en baño de agua a 50°C. Se midió la absorbancia a 470 nm a tiempo 0 min y a 120 min. La actividad antioxidante se mide como el coeficiente de actividad antioxidante (AAC) calculado como:

$$AAC = [(A_{ext\ 120\ min} - A_{c\ 120\ min}) / (A_{c\ 0\ min} - A_{c\ 120\ min}) \times 1000]$$

Donde, Aext es la absorbancia del extracto y Ac es la absorbancia del control.

2.3.6 DETERMINACIÓN DE α -TOCOFEROL

La determinación del contenido en α -tocoferol se realizó de acuerdo al método establecido por Sánchez-Machado *et al.* (2002). Para ello 0.25 g de biomasa liofilizada se pusieron en un tubo de ensayo con tapón, se le agregó 200 μ l de una solución de pirocatecol (1 g en 5 ml de metanol) y 5 ml de una solución metanólica de KOH 0.5 M, y se agitó en un vórtex durante 20 min. Los tubos se pusieron en un baño de agua a 80°C durante 15 min, agitando cada 5 min durante 15 s. Tras enfriar las muestras en un baño de agua; se añadió 1 ml de agua y 5 ml de hexano y se agitó durante 1 min, se centrifugó a 3973 g durante 2 min. La fase superior se transfirió a otro tubo y se evaporó hasta sequedad bajo flujo de nitrógeno.

El residuo fue redissuelto en 1 ml de la fase móvil (metanol:acetonitrilo 30:70), después se filtró en membranas Millipore con tamaño de poro de 0.45 μ m. Se inyectaron 50 μ l en el HPLC con una temperatura de la columna de 30°C con la fase móvil de metanol:acetonitrilo (30:70) en modo isocrático con un flujo de 1 ml/min y la detección se hizo a una longitud de onda de 205 nm. La identificación y cuantificación se hicieron por comparación del tiempo de retención del estándar de α -tocoferol, para lo cual se preparó una curva de calibración en un rango de 3-120 μ g/ml (Fig. 2.11).

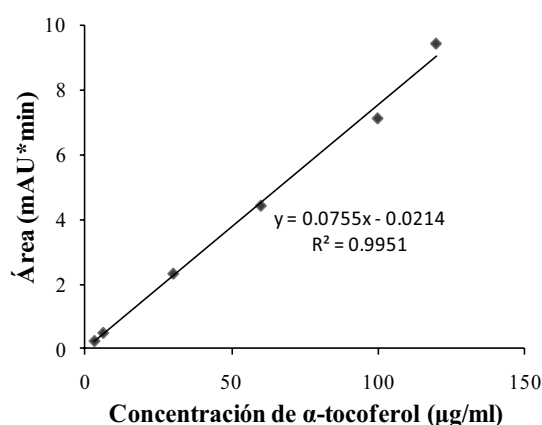


Figura 2.11. Curva de calibración de α -tocoferol en HPLC medida a 205 nm para determinar el contenido en *T. suecica*.

2.3.7 DETERMINACIÓN DE CLOROFILA Y CAROTENOIDES TOTALES

La clorofila y los carotenoides totales fueron extraídos de 3 mg de biomasa liofilizada con 5 ml de acetona:metanol (2:1 v/v). Para la completa extracción de los pigmentos, las muestras se dejaron en oscuridad a 4°C durante 24 h. Los extractos se clarificaron por centrifugación (3900g durante 10 min) y después se midió la absorbancia a 480, 664 y 647 nm en un espectrofotómetro JASCO V-530. El contenido de clorofila y carotenoides totales fueron estimados de acuerdo con la fórmula establecida por Jeffrey and Humphrey (1975):

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totales (}\mu\text{g/ml)} = 4 A_{480}$$

Donde A es la absorbancia de la muestra a diferente longitud de onda.

2.3.8 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FUCOXANTINA Y β -CAROTENO

La extracción de los carotenoides fue hecha de acuerdo al método propuesto por Subagio *et al.* (1996), donde a 250 mg de biomasa liofilizada se le adicionó 6.66 ml de una mezcla hexano:acetona:etanol en proporción 2:1:1, se dejó en agitación en oscuridad durante 24 h. Después de éste tiempo se añadió 0.33 ml de una solución metanólica de KOH al 40%, se agitó y se dejó en oscuridad a temperatura ambiente durante 8 h para lograr la saponificación de los lípidos. Se filtró a través de una membrana Millipore con tamaño de poro de 0.45 μm , se puso en un embudo de separación y se lavó 3 veces con 6.66 ml de agua destilada; la fase superior se transfirió a un tubo y se secó bajo flujo de nitrógeno. El residuo fue re-suspendido en 0.5 ml de metanol y se filtró a través de una membrana Millipore con tamaño de poro de 0.45 μm .

La identificación se hizo de acuerdo con el método cromatográfico establecido por Minguez-Mosquera y Hornero-Sánchez (1993) por el cual se inyectan 50 μl de muestra en el HPLC con un flujo de 1.2 ml/min (acetona fue la fase móvil A y agua fue la fase móvil B). El gradiente de elución se inició con 25% de B y se mantuvo 5 min, después se inicia la rampa cambiando de 25% a 5% de B hasta los 10 min y se mantuvo a 5% de B durante 15 min. La temperatura de la columna

fue de 30°C y la longitud de onda de 450 nm para la detección de los carotenoides. La identificación fue hecha por comparación con el tiempo de retención de los estándares de fucoxantina (Fig. 2.12) y β -caroteno (Fig. 2.13) con un rango de curva de calibración de 0 a 80 $\mu\text{g/ml}$ y de 0 - 800 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

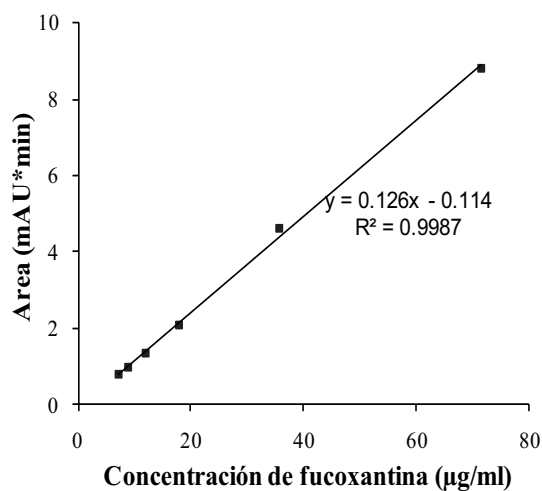


Figura 2.12. Curva de calibración de fucoxantina para determinar su contenido en los extractos de *T. suecica*.

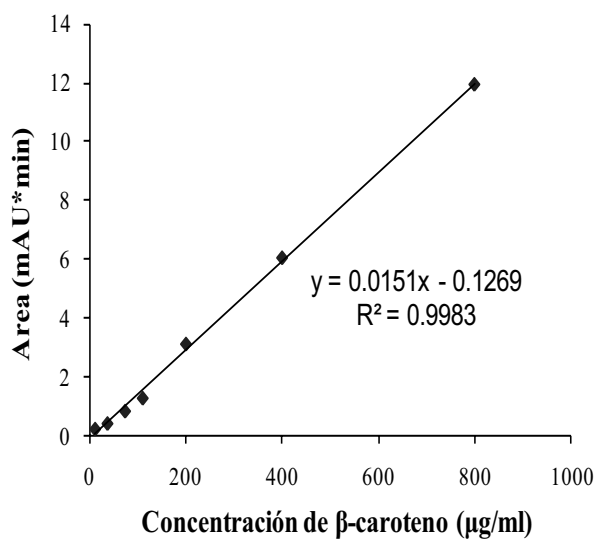


Figura 2.13. Curva de calibración de β -caroteno para determinar su contenido en los extractos de *T. suecica*.

2.4 SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS

Para la construcción de los sistemas bifásicos acuosos (ATPS por sus siglas en inglés) se utilizaron 2 polímeros: tween 20 y triton X-102 los cuales se combinaron con 9 sales sódicas: carbonato, tartrato, citrato, acetato, colato, alginato, sulfato, sulfito y tiosulfato disueltas en agua destilada. Por lo tanto, se llevaron a cabo 18 sistemas con 3 rectas de reparto para cada uno.

Las curvas binodales se determinaron mediante el método de punto de niebla a temperatura ambiente y presión atmosférica (Albertsson, 1986). El sistema se inició agregando una cantidad conocida de surfactante a un tubo de vidrio con tapón. A dicho tubo se le agregó gota a gota una disolución saturada de sal de fracción másica conocida, con agitación constante hasta que la mezcla se tornó turbia. La composición de esa mezcla fue anotada. Después se añadió agua gota a gota, hasta conseguir un sistema monofásico, y posteriormente se volvió a adicionar más disolución salina hasta formar el ATPS, realizándose este proceso repetitivamente hasta tener el número de valores necesarios para construir la curva binodal. La composición del sistema ternario fue determinada por la cuantificación del peso de todos los componentes dentro de una incertidumbre de 10^{-4} g.

La curva binodal fue ajustada por el método de mínimos cuadrados al modelo empírico propuesto por Merchuk *et al.* (1998):

$$Y_A = a \exp(bX_A^{0.5} - cX_A^3)$$

Donde Y_A y X_A son la concentración del surfactante y la sal, respectivamente. Las constantes a , b y c fueron obtenidas por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

La determinación de las líneas de reparto se inició con la adición de una mezcla ternaria dentro de la región inmiscible de una fracción másica conocida, la

temperatura se mantuvo constante, la mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 24 h para asegurarse la separación completa de las fases. La incertidumbre en la determinación de la composición másica de las fases del surfactante y la sal fue de 10^{-4} g.

Las rectas de reparto se estimaron por la aplicación de la regla de la palanca para establecer la relación entre la composición másica de la fase y la composición total del sistema, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$Y_T = (Y_M/R) - ((1 - R)/R)Y_B$$

$$X_T = (X_M/R) - ((1 - R)/R)X_B$$

Donde, M, T y B representan la mezcla, la fase superior y la fase inferior, respectivamente; Y y X son la concentración del surfactante y la sal; y R es la relación entre la masa de la fase superior y la masa de la mezcla:

$$R = (\text{peso de la fase superior})/(\text{peso de la mezcla})$$

2.4.1 DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE PARTICIÓN DE COMPUESTOS ESTÁNDARES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN ATPS

En *T. suecica* se han identificado y cuantificado el contenido de α -tocoferol, β -caroteno y polifenoles como algunos de los compuestos con actividad antioxidante, por ello se adicionaron cantidades conocidas de α -tocoferol, β -caroteno y ácido gálico como estándares y se mezclaron con disoluciones acuosas de los surfactantes seleccionados. También se añadieron carbonato de sodio, citrato de sodio y tartrato de sodio hasta alcanzar el punto deseado en la región de inmiscibilidad. Las mezclas se dejaron en reposo durante 12 h para alcanzar la completa separación de las fases. Se tomaron simultáneamente muestras de la fase superior e inferior mediante una jeringa.

El contenido de α -tocoferol, β -caroteno y ácido gálico en cada fase se determinó mediante análisis en HPLC y espectrofotómetro, según la metodología descrita anteriormente.

2.4.2 UTILIZACIÓN DE ATPS PARA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN MICROALGAS

A) RUPTURA CELULAR

La extracción y purificación de compuestos biológicos es una de las aplicaciones de los sistemas ATPS. En base a esto, se mezclaron 250 mg de biomasa liofilizada de *T. suecica* con 8.25 mL de una solución al 0.1%, 1% y 5% de diferentes surfactantes como tween 20, tween 40, tween 80, tritón X-100, tritón X-102 y tritón X-114, según se describe en la tabla 2.2. Todas las mezclas fueron agitadas durante 48 h. Paralelamente y como método de referencia también se usó un método tradicional de ruptura celular que consistió en sonicar una mezcla de 250 mg de biomasa liofilizada con 8.25 mL de agua destilada durante 8 min a 0.5 ciclos y 60% de la máxima potencia (Dr. Hielscher, Teltow, Germany, model UP200s).

En ambos casos, tanto las muestras iniciales como finales fueron analizadas en un microscopio óptico (40X) y las imágenes obtenidas se procesaron con el software Image Pro-Plus.

Tabla 2.2. Efecto surfactante de polímeros para la ruptura celular y extracción de compuestos intracelulares de *T. suecica*.

| Masa de microalga (mg) | Polímero (4 ml) | Concentración |
|-------------------------------|------------------------|----------------------|
| 250 | Tween 20 | 1, 20 y 50% |
| 250 | Tween 40 | 0.1, 1 y 5% |
| 250 | Tween 80 | 0.1, 1 y 5% |
| 250 | Tritón X100 | 0.1, 1 y 5% |
| 250 | Tritón X102 | 10, 20 y 30% |
| 250 | Tritón X114 | 0.1, 1 y 5% |
| 250 | Agua | Control |

B) PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para la preparación de los extractos usados en los ATPS se adicionó 1 g de biomasa liofilizada en un matraz y se agregaron 33 ml de una solución acuosa del surfactante seleccionado a una concentración adecuada. La mezcla se agitó durante 2

días a temperatura ambiente. Este método fue comparado con una extracción tradicional, donde 1 g de biomasa liofilizada se mezcló con 33 ml de agua destilada y se puso en un baño de ultrasonido (Elmasonic S40H, Germany) durante 45 min. Los extractos se centrifugaron (Sigma laborzentrifugen, Germany) a 360 g durante 10 min y el sobrenadante fue recogido y filtrado a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.45 μm , type Millex GN filter (Millipore, USA).

2.5 APLICACIÓN DE EXTRACTOS DE *T. SUECICA* EN CÉLULAS CANCERÍGENAS DE PRÓSTATA HUMANA

2.5.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Se prepararon diferentes extractos de la biomasa de *T. suecica* con la finalidad de probar su efecto en líneas celulares cancerígenas de próstata. En la tabla 3.3 se muestra la codificación de las muestras utilizadas en este ensayo. La extracción se realizó de la misma forma cuando se utilizó metanol, etanol, metanol-agua (50%): a 20 g de biomasa se adicionaron 600 ml del disolvente, se agitó vigorosamente y se puso en baño de ultrasonido con hielo durante 45 min. Después, se centrifugó a 3500 g durante 10 min y se separó la parte líquida, que se filtró primero a través de papel filtro Whatman n°. 1 y posteriormente a través de una membrana de 45 µm de tamaño de poro, Una vez filtrado se evaporó el disolvente en el rotavapor y se liofilizó.

Además se preparó un extracto acuoso, donde a 6 g de biomasa liofilizada se le agregaron 180 ml de agua y se sometió a un ultrasonido UIP1000HD (Dr. Hielscher) durante 35 s a una amplitud del 75%. Una vez sonicado, se centrifugó y se realizó la misma operación que la realizada para los extractos anteriores.

Por otra parte, se prepararon extractos aplicando una extracción secuencial con hexano, acetato de etilo y agua; para ello, a 20 g de biomasa se le agregaron 200 ml de hexano, se agitó vigorosamente y se dejó en contacto durante 30 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 3500 g durante 10 min y se recogió el sobrenadante. Este proceso se repitió 2 veces para el hexano, se juntaron los sobrenadantes y se evaporó el disolvente en un rotavapor. Una vez terminada la extracción con hexano, a la biomasa residual de esa extracción se le adicionaron 200

ml de acetato de etilo y se realizó el mismo procedimiento que para el hexano; finalmente se hizo una extracción con agua a 80°C en las mismas condiciones que la extracción anterior. Una vez evaporados los disolventes, los sólidos fueron liofilizados.

Tabla 3.3 Codificación de extractos de *T. suecica* utilizados en el ensayo celular.

| Código de muestra | Disolvente | Método aplicado |
|-------------------|--------------------|-----------------------|
| TSUS1 | Agua | Ultrasonido |
| TSUS2 | Metanol-agua (50%) | Baño de ultrasonido |
| TSUS3 | Metanol | Baño de ultrasonido |
| TSUS4 | Etanol | Baño de ultrasonido |
| TSES1 | Hexano | Extracción secuencial |
| TSES2 | Acetato de etilo | Extracción secuencial |
| TSES3 | Agua | Extracción secuencial |

2.5.2 ENSAYO CELULAR

La actividad anticancerígena de los extractos se determinó en líneas celulares de cáncer de próstata andrógeno independientes (PC-3). Estas células PC3 se obtuvieron a través de la American Type Culture Collection (pasaje 7; CRL-1435, London, UK). Las células PC3 se cultivaron en medio F-12K (ATCC 30-2004, modificación Kaighn's del medio F-12 Ham's) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y solución antibiótica-antimicótica al 1% (ATCC). Las células fueron sembradas e incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada al 95% y una concentración de CO₂ del 5% (Siddiqui y Shabbi, 2006).

2.5.3 MEDICIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)

Para la medición de la proteína de expresión del VEGF, las células PC-3, se sembraron en una placa de cultivo de 96 pozos (BD, Madrid, España) a una densidad de 5000 cel/pozo y se mantuvieron en cultivo con medio suplementado con 10% de FBS durante 24 h a 37°C. Posteriormente, a las monocapas de PC-3 se añadieron diferentes concentraciones (50, 100 y 200 ppm) de los extractos de *T. suecica* (Fig. 2.14) por un período de 48 h; transcurrido ese tiempo, se determinó el nivel de VEGF

en los sobrenadantes mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Bionova científica, Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pei *et al.* 2008).

Brevemente, se añadieron 100 μ L del sobrenadante del cultivo celular en cada uno de los pocillos (Fig. 2.15) y se incubaron durante 2.5 h a temperatura ambiente con agitación suave. Después se hicieron 3 lavados de 300 μ L y se añadieron 100 μ L del anticuerpo biotinado en cada uno de los pocillos. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, se hicieron 4 lavados de 300 μ L y se añadieron 100 μ L de una solución de estreptavidina en cada uno de los pocillos y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente con agitación suave. Se realizaron 4 lavados con 300 μ L y se añadieron 100 μ L de tetrametilbencidina y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave y en la oscuridad. Después de la adición de tetrametilbencidina, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Bio-Tek ELx800. Para la estandarización, se realizaron diluciones seriadas de la VEGF recombinante humana.



Figura 2.14 Extractos de la microalga *Tetraselmis suecica*.

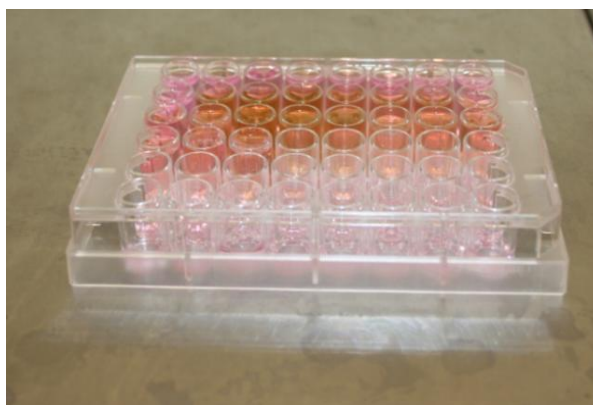


Figura 2.15 Placa de pocillos para la realización de la medición de VEGF mediante ELISA.

2.5.4 VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se determinó mediante el método de tinción con azul tripán. El azul tripán es un colorante vital que se introduce en las células que presentan ruptura o daño en la membrana plasmática. La viabilidad celular fue expresada en %.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se aplicó un ANOVA de un factor utilizando el Test de Duncan para comparaciones múltiples de $p < 0,05$ (SPSS, versión 15.0); para las comparaciones donde $p \leq 0,001$ se utilizó el test T3 Dunnet. Para la determinación de la correlación entre 2 variables se utilizó la correlación de Pearson. Los cultivos y análisis se hicieron por triplicado y en los resultados se muestra el promedio y la desviación estándar de ellos.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CULTIVO DE *T. SUECICA* CON ADICIÓN DE MAGNESIO, SILICIO Y ESTRONCIO AL MEDIO DE CULTIVO

Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos de esta Tesis es mejorar la producción de biomasa de la microalga marina *Tetraselmis suecica* y en consecuencia incrementar la producción de compuestos bioactivos, mediante la modificación del medio y el volumen del cultivo. Una vez realizado esto se investigará la implementación de un proceso de *downstream* más respetuoso con el medio ambiente, que permita extraer los compuestos bioactivos intracelulares, y todo ello enfocado a la inducción de compuestos con actividad antioxidante y posible efecto antiangiogénico en células cancerígenas de próstata.

En primer lugar, se ensayó un medio de cultivo para *T. suecica* conteniendo magnesio, silicio y estroncio en concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 3 y 10 mM. Posteriormente, y con el medio que proporcionó mejores resultados para la producción de compuestos antioxidantes, se realizaron cultivos en reactores de diferentes formas y volúmenes (80 ml, 5 L y 80 L). Una vez lograda la producción a gran escala, se evaluó la actividad antioxidante de extractos preparados con diferentes disolventes. Además se aplicó un proceso no convencional para la extracción de compuestos activos intracelulares de *T. suecica*. Finalmente se evaluó el efecto anti-cancerígeno de los extractos de *T. suecica* en líneas celulares cancerosas de próstata humana.

3.1.1 REACTORES CON 80 ML DE CULTIVO

Se emplearon inicialmente tubos con un volumen de 80 ml de cultivo (ver sección 2.1.2 de materiales y métodos). Las condiciones del cultivo, el sistema

elegido y la composición del medio van a afectar decisivamente al crecimiento de las microalgas (Fábregas *et al.* 1985). En este trabajo se evaluó el efecto de la adición al medio de magnesio, silicio y estroncio en las concentraciones antes mencionadas, analizando su repercusión en la densidad celular del estado estacionario, en la composición bioquímica y en la actividad antioxidante de *T. suecica* producida en cultivo semicontinuo. Debido a la alta densidad celular obtenida en los cultivos con magnesio (3 mM) y estroncio (0.1mM), también se realizó un cultivo en el cual se adicionó una mezcla de ambos para verificar si existe un efecto sinérgico de los dos elementos. Teniendo en cuenta de que la alta productividad está siempre relacionada con la alta densidad celular, se evaluó también ésta relación.

3.1.2 DENSIDAD CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO DE *T. SUECICA*

El cultivo en *batch* alcanzó la fase estacionaria a los 6 días, con una densidad celular de 13 a 16x10⁶ cel·ml⁻¹ y una tasa específica de crecimiento (μ) de 0.36 d⁻¹ en promedio para los cultivos con magnesio, y de 0.34 d⁻¹ en los cultivos con silicio y estroncio, sin haber una correlación significativa entre la μ y la concentración de magnesio, silicio y estroncio (Fig. 3.1). Sin embargo, se encontró una pequeña diferencia en la μ promedio de los diferentes tratamientos con los oligoelementos adicionados al medio de cultivo de *T. suecica* siendo la μ de los cultivos con magnesio ligeramente mayor a la μ del control (0.32 d⁻¹).

Mientras que la adición de magnesio, silicio y estroncio no afecta al crecimiento de *T. suecica* en cultivo *batch*, se encontraron importantes diferencias en la densidad celular en el estado estacionario del cultivo semicontinuo de *T. suecica* (Fig. 1 del anexo 1). El magnesio no supuso efecto inductor alguno a concentraciones menores a 1 mM, mostrando densidades celulares similares al control (4.4 x 10⁶ cel. mL⁻¹), pero se observó un efecto positivo con las dos mayores concentraciones probadas, alcanzando un incremento significativo (Tukey p>0.05) del 68% y 40% mayor que el control, respectivamente. Este hecho llama la atención porque la concentración de magnesio es generalmente baja en la formulación del medio de cultivo con agua de mar artificial y agua dulce para microalgas, encontrándose en un rango de 0.04 a 1 mM (Nichols 1973) y la concentración de magnesio en agua de mar natural es de 5.28 mM en promedio (Culkin y Cox 1966); en este trabajo, los

resultados indicaron que *T. suecica* tiene un requerimiento mayor de magnesio que el contenido en el agua de mar.

Además, Bittencourt *et al.* (2010) demostraron en diferentes tipos de microalgas (marinas y de agua dulce) que magnesio y nitrógeno se consumen constantemente durante el crecimiento celular, demostrando que las células requieren de disponibilidad constante de magnesio y nitrógeno, independientemente de la etapa de crecimiento.

Por otra parte, la alta densidad celular alcanzada con la adición de magnesio (3mM) puede deberse a que es el átomo central de la molécula de clorofila, la cual tiene un papel importante en la actividad fotosintética. Además, el magnesio también forma parte de enzimas fotosintéticas magnesio-dependientes (Shaul 2002). La incorporación de fósforo, el cual influye fuertemente en el crecimiento de las microalgas debido a su papel en los procesos energéticos de la célula y en la síntesis de ácidos nucleicos, se va a ver afectado por factores como el pH, la presencia de magnesio y la existencia de varios metales pesados (Becker 1994). Además, el magnesio puede regular el transporte de la membrana celular a través de los canales de calcio (Ca^{+2}) mediante el aumento de su permeabilidad (Pasternak *et al.* 2010).

De los resultados mostrados en la Fig. 1 del anexo 1, se concluye que existe un efecto positivo en la densidad celular del estado estacionario con la adición del silicio a una concentración 3 mM, alcanzando una densidad de $6.0 \pm 0.3 \times 10^6$ cel mL⁻¹. El efecto del silicio es conocido en el crecimiento de las diatomeas, pero existe poca información en microalgas que no requieren de este elemento para crecer. La razón de este incremento en la densidad celular no es fácil de explicar. En este sentido, Exley *et al.* (1993) observaron que en *Chlorella vulgaris* (una microalga que no requiere silicio) el silicio estimulaba el crecimiento en presencia de aluminio, un hecho que atribuyeron a una posible mayor biodisponibilidad de fósforo cuando existe aluminio en el medio. Contrariamente a esto, se ha publicado que *Platymonas* (*Tetraselmis*) sp, otra microalga que no requiere silicio para crecer, no se vio afectada por la adición de este elemento al medio de cultivo, mostrando el mismo crecimiento en ambientes ricos o deficientes de silicio (Fuhrman *et al.* 1978). También se sabe que el Na_2SiO_3 es ligeramente soluble en agua a pH cercanos a la

neutralidad y solamente es hidrolizado a sodio libre y a ácido silícico (forma biodisponible) cuando la solución se calienta o acidifica (Clayton y Clayton 1993). Por lo tanto, aunque el silicio no sea asimilado por la célula, puede inducir la incorporación de cationes como Ca^{2+} y especialmente Mg^{2+} , cuyo contenido fue 7 veces mayor respecto al control con la adición de silicio 10 mM (Fig. 3, anexo 1), lo que promueve el crecimiento celular como se menciona anteriormente. En resumen, se debe considerar realizar una profunda investigación en el futuro sobre el efecto del silicio en el crecimiento y productividad de *T. suecica*.

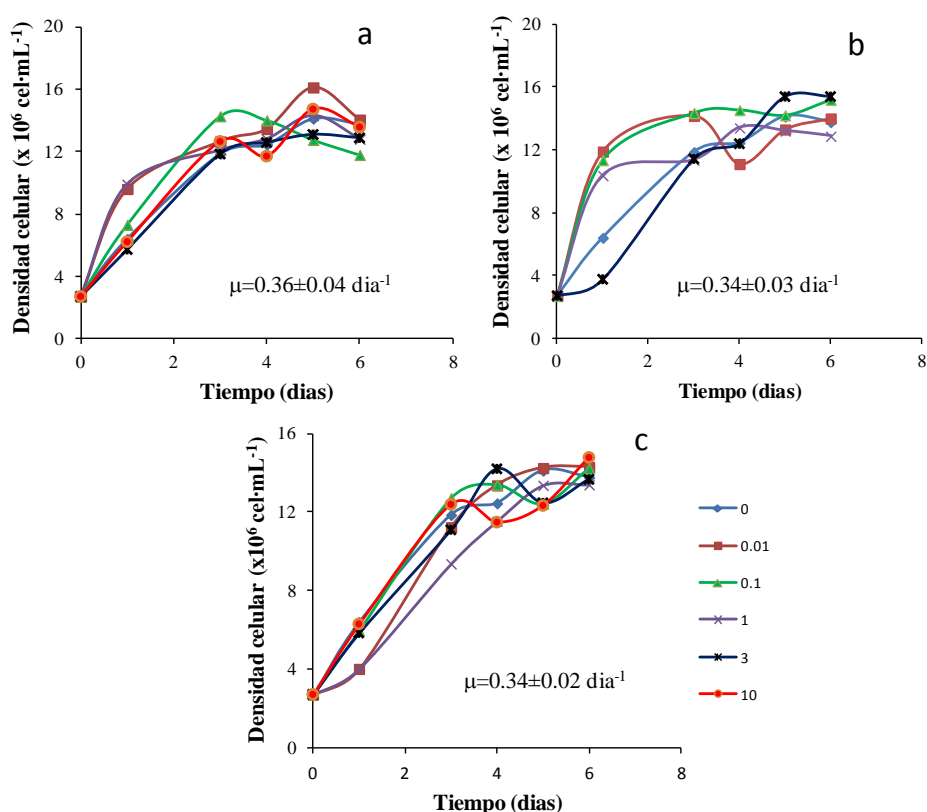


Figura 3.1 Comportamiento del crecimiento celular de *Tetraselmis suecica* en el cultivo batch a) Cultivo con adición de magnesio en concentraciones de 0.01 a 10 mM, b) Cultivo con adición de silicio en concentraciones de 0.01 a 10 mM y c) Cultivo con adición de estroncio en concentraciones de 0.01 a 10 mM.

Por otra parte, los mayores niveles de densidad celular se lograron con la adición de estroncio en concentraciones desde 0.01 a 1 mM alcanzando $7.0 \pm 0.9 \times 10^6$ y $6.9 \pm 0.5 \times 10^6$ cel mL⁻¹, respectivamente (Fig. 1 del anexo 1). A concentraciones mayores la densidad celular disminuyó. A pesar de que el estroncio no es considerado un nutriente esencial en las microalgas marinas, se consideró su adición al medio de cultivo en base a un resultado preliminar que se obtuvo de *T. suecica* en

un cultivo sin añadir magnesio o estroncio. A partir de esos resultados, se encontraron cantidades similares de ambos elementos, a pesar que la concentración de magnesio en el agua de mar es 160 veces mayor que la concentración de estroncio (Summerhayes y Thorpe 1996), lo que sugiere que esta especie tiene un comportamiento singular. Esta observación fue confirmada mediante el análisis de microelementos (Fig. 3 anexo 1) en la biomasa del cultivo con silicio 10 mM y estroncio 10 mM, debido a su gran contenido de cenizas (alrededor del 50%) y se compararon con el control. Este análisis muestra una gran acumulación de estroncio en la biomasa de la microalga.

Por otra parte, en este trabajo, las concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 mM de estroncio indujeron una elevada densidad celular en el estado estacionario, que disminuyó al aumentar la concentración, tal vez debido a que causó estrés metálico. En cualquier caso, la densidad celular de todas las concentraciones ensayadas de estroncio fue mayor a las reportadas por Otero y Fábregas (1997) cuando se operó en condiciones similares a las del cultivo control de este trabajo.

Li *et al.* (2004) describieron la habilidad del estroncio para remplazar al calcio en los huesos animales, siendo posible también que ocurra un fenómeno similar en las microalgas, lo que conducirá a diferencias en la composición de la pared celular o en el incremento del tamaño celular (Becker 1994). De este modo, la microalga *Eresmophaera viridis*, cultivada con altas concentraciones de estroncio, mostró una alta despolarización de la membrana y una interacción competitiva del estroncio con los canales de Ca^{+2} de la membrana plasmática (Bauer *et al.*, 1998).

A primera vista, los canales iónicos pueden afectar a la proliferación celular de 2 formas: por una parte, cualquier célula requiere la función de los canales iónicos para mantener los parámetros homeostáticos como la concentración intracelular de iones, el pH citosólico y el volumen celular y permitir la asimilación de sustancias y la liberación de los productos metabólicos. Por otra parte, es necesaria la actividad de los canales iónicos durante el ciclo celular debido a la relevancia específica en la proliferación celular (Kunzelmann 2005). En este sentido, se cultivó la microalga *Dicateria inornata* en un medio enriquecido con estroncio y se obtuvo un alto crecimiento celular y alto contenido de clorofila *a*. Sin embargo, a una alta

concentración (23 mM) se hizo evidente una disminución en la densidad celular y en el contenido de clorofila *a* (Li *et al.* 2004). Posteriormente, Li *et al.* (2006) encontraron una ligera disminución de la densidad celular en cultivos de *Platymonas (Tetraselmis) subcordiformis* cuando se adicionó estroncio en el medio a una concentración de 5 mM ó 11 mM, mientras que las concentraciones por debajo de 1.4 mM no causaron inhibición del crecimiento, coincidiendo con los resultados observados en este trabajo.

Cabe mencionar que en los cultivos a los que se adicionó 10 mM de estroncio se formó un precipitado que se depositó en las paredes del reactor. Esto puede ser debido al exceso de estroncio o a las actividades metabólicas de la célula permitiendo la precipitación del metal, directamente, a través de reacciones redox catalizadas microbiológicamente, o indirectamente, a través de la producción y secreción de ligandos inorgánicos como los carbonatos (Brown *et al.* 2006).

También se realizó un cultivo para estudiar un posible efecto sinérgico del magnesio (3 mM) y el estroncio (0.1 mM). Las concentraciones utilizadas fueron las que dieron lugar a la mayor densidad celular cuando se adicionaron separadamente, y se obtuvo un mayor incremento en la densidad celular del estado estacionario ($8.7 \pm 0.61 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Finalmente, como uno de los propósitos de este estudio fue lograr una alta densidad en el estado estacionario de los cultivos de *T. suecica* operando en modo semicontinuo mediante la adición de magnesio, silicio y estroncio al medio de cultivo y de acuerdo con los resultados antes mencionados, se recomienda la adición de estos elementos al medio de cultivo en concentraciones de 3mM, 3 mM y 0.1 mM, respectivamente, y así lograr cultivos de *T. suecica* con alta densidad celular.

3.1.3 PESO SECO LIBRE DE CENIZAS (AFDW) Y PRODUCTIVIDAD

En la Fig. 2 del anexo 1 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de magnesio, silicio y estroncio sobre el peso seco y la productividad en biomasa (ambos sobre base libre de cenizas). A pesar de que, como ya se comentó, el magnesio 3 mM tuvo un notable efecto sobre la densidad celular, su adición no fue significativa en AFDW ni en la productividad, pues sus valores se aproximan a los del control.

El AFDW fue influenciado principalmente por la adición de silicio y estroncio (Fig. 2 del anexo 1). Por una parte, el silicio a concentración 3 y 10 mM incrementó el AFDW, con productividades significativamente altas (Tukey $p < 0.05$). Por otra parte, la adición de estroncio, en todas las concentraciones probadas, afectó negativamente la productividad. En general, se observó una relación inversa entre la productividad y la concentración de magnesio y estroncio, mientras que existe una correlación directa para los tratamientos con silicio ($R^2 = 0.90$). También se encontró una alta correlación entre la densidad celular y la productividad de los tratamientos con magnesio ($R^2 = 0.91$), silicio ($R^2 = 0.89$) y estroncio ($R^2 = 0.87$). En general, la adición de magnesio 1 mM y estroncio 0.1 mM proporcionan buenos valores de productividad, aunque solo el silicio mejoró notablemente los valores del control.

Así mismo, se determinó la composición de las cenizas de la biomasa producida en los tratamientos: control, silicio 10 mM y estroncio 10 mM (por su alto contenido de cenizas), para lo cual se analizó el contenido de 26 elementos traza, aunque solo los principales se presentan en la fig. 3 del anexo 1, representando el 99% del contenido total. El análisis de la biomasa reveló que en el tratamiento con silicio se promueve la incorporación de otros cationes como Na^{+1} , Ca^{+2} y Mg^{+2} . Por el contrario, en el tratamiento con estroncio, éste fue incorporado principalmente ($66.8 \pm 5.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco), hasta 9 veces más que lo encontrado en el control ($7.3 \pm 0.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco).

Finalmente, la adición de esos elementos traza favoreció el aumento de la productividad AFDW, respecto a la mencionada por autores como Rodolfi *et al.* (2009) en cultivo en *batch* (de 0.28 a $0.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$) o la obtenida por Seixas *et al.* (2008) y Chini-Zittelli *et al.* (2006) en cultivo semicontinuo ($0.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ y $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ en matraces de 1 L y columnas anulares de 120 L, respectivamente). Sin embargo, la productividad de biomasa obtenida en este trabajo con silicio 3 mM fue hasta 3 veces superior a las previamente citadas.

3.1.4 COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA

Como ya se ha mencionado previamente, la composición bioquímica de *T. suecica* varía de acuerdo con las condiciones de cultivo, las técnicas de cultivo y la composición del medio. En este trabajo se adicionó magnesio, silicio y estroncio con

el fin de modificar la composición del medio de cultivo, pero manteniendo la concentración de N-NO₃ a 4 mM y una tasa de renovación del 40%. El porcentaje de proteína, lípidos y carbohidratos se presentan con base al peso seco celular libre de cenizas (AFDW) (Fig. 4 del anexo 1).

Se observa que la adición de elementos traza al medio no afectó al contenido de proteína. Únicamente las concentraciones 0.01 y 1 mM de magnesio, y la concentración de 0.01 mM de silicio promovieron mayor contenido de proteína que el control.

El porcentaje de lípidos aumentó significativamente con estroncio 3 y 10 mM, mientras que la adición de silicio implicó una reducción (Fig. 4b del anexo 1). También el contenido de carbohidratos varía al adicionar estroncio 1 mM al medio de cultivo (Fig. 4c del anexo 1). Además, se observa que la concentración de silicio se relaciona negativamente con el porcentaje de proteínas y carbohidratos y los valores en todos los casos fueron menores que los encontrados en el control.

En general, del análisis de la composición bioquímica se concluye que la adición de magnesio y estroncio (en alguna de las concentraciones probadas) indujo un ligero incremento del porcentaje de proteína, lípidos y carbohidratos. Por una parte, no se puede descartar la limitación de algunos nutrientes (principalmente nitrógeno) debido a la alta densidad celular y el estrés metálico generado. Roessler (1988) observó que las microalgas acumulan lípidos cuando sufren estrés ambiental, que podría ser el caso de los cultivos realizados con estroncio a concentración 3 y 10 mM. Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que *T. suecica* acumula carbohidratos de reserva, porque estroncio 1 mM originó una alta densidad celular en el estado estacionario, quizás como consecuencia de una baja disponibilidad de nitrógeno por célula. En este sentido, Thomas *et al.* (1984) observaron que los carbohidratos se acumularon como energía de reserva bajo condiciones de limitación de nitrógeno. De acuerdo con esto, Otero y Fábregas (1997) observaron el mismo efecto en *T. suecica* cultivada en modo semicontinuo con baja tasa de renovación, lo que confirma el comportamiento mostrado en este trabajo.

Por otra parte, la adición de elementos traza a los cultivos de *T. suecica* no parece influenciar el contenido de ácidos grasos, como se desprende de los datos

mostrados en la Tabla 1 del anexo 1. Todas las concentraciones probadas de estroncio, magnesio y silicio (3 y 10 mM para éstos dos últimos) llevaron a niveles de ácidos grasos entre 42 y 52% del total de lípidos, logrando el máximo contenido de ácidos grasos con estroncio a 10 mM ($10.2 \pm 0.3 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$), un valor significativamente mayor al control (Tukey $p < 0.05$).

Los ácidos grasos presentes en la célula mostraron el siguiente orden de abundancia: $16:0 > 18:1\omega-9 > 18:3\omega-3 > 16:4\omega-3 > 18:2\omega-6 > 20:5\omega-3 > 18:4\omega-3$ (Tabla 1 del anexo 1). Los ácidos grasos saturados y mono-insaturados (16:0 y 18:1) fueron más abundantes en el control y se puede concluir que la adición de los elementos traza empleados afecta ligeramente su contenido. Los ácidos grasos $\omega-3$ mostraron una relación directa con la concentración de los elementos traza. Los mayores niveles alcanzados en el contenido de ácidos grasos fueron similares a los referenciados por otros autores (Mendoza *et al.* 2010; Otero y Fábregas 1997).

3.1.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES

En la siguiente etapa del trabajo se evaluó la concentración de polifenoles y la actividad antioxidante en los extractos metanólicos de la biomasa de *T. suecica* (Fig. 5 del anexo 1). Se usó el método de captura de radicales libres DPPH, representándose la actividad antioxidante como porcentaje de inhibición del DPPH. El contenido de polifenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico por gramo de biomasa seca ($\text{mgGAE} \cdot \text{g}^{-1}$). Se encontró una concentración máxima de polifenoles ($3.5 \pm 0.24 \text{ mgGAE} \cdot \text{g}^{-1}$) en el tratamiento con estroncio 10 mM, presentando también el máximo porcentaje de inhibición de DPPH ($77.0 \pm 1.7\%$), el cual es significativamente mayor que el valor del control (Tukey $p < 0.05$). Además, se encontró una correlación lineal ($R^2 = 0.98$) entre el contenido de polifenoles y el porcentaje de inhibición del DPPH como se muestra en la fig. 5b del anexo 1, lo que sugiere que los compuestos polifenólicos del extracto metanólico pueden ser los responsables de la actividad antioxidante.

Los cultivos suplementados con silicio a concentración de 0.01 mM mostraron máximo de $40.2 \pm 2 \%$ de inhibición del DPPH y de $1.2 \pm 0.07 \text{ mgGAE} \cdot \text{g}^{-1}$. Además, el coeficiente de correlación lineal entre el contenido de polifenoles y el porcentaje de inhibición del DPPH fue razonablemente alto ($R^2 = 0.67$). Por otra parte,

en los cultivos con magnesio, se alcanzó la máxima inhibición del DPPH a una concentración 1 mM ($41.2 \pm 2.2\%$) y el contenido de polifenoles fue de 1.1 ± 0.08 mg GAE·g⁻¹. La correlación entre el contenido de polifenoles y el porcentaje de inhibición del DPPH fue muy baja ($R^2=0.005$), indicando la ausencia total de una relación en esos cultivos.

Las microalgas son microorganismos que realizan la fotosíntesis oxigénica y en ese proceso se producen especies de oxígeno reactivo y radicales libres. Para su defensa, las microalgas producen compuestos antioxidantes para evitar los daños oxidativos (Lu y Foo 1995). En algunas microalgas, la actividad antioxidante se atribuye al contenido de ácidos grasos insaturados (Li *et al.* 2006) o al sinergismo entre diversos compuestos en las microalgas (Rodríguez-García y Guil-Guerrero 2008) como fenoles simples, vitamina E y carotenoides (Rodríguez-Meizoso *et al.* 2010).

El alto porcentaje de inhibición del DPPH de los extractos obtenido en este trabajo fue similar a los valores obtenidos (71% de inhibición) cuando se usó la digestión enzimática para la preparación de los extractos de *T. suecica* cultivada sin adición de estroncio al medio de cultivo (Lee *et al.* 2009). La digestión enzimática se aplicó para eliminar materiales de la pared celular de la microalga, la cual interfiere en la extracción adecuada de los compuestos bioactivos. En *Platymonas (Tetraselmis) subcordiformis*, el estroncio indujo estrés oxidativo y la actividad antioxidante se incrementó un 55% en comparación con el control, midiendo la actividad de la enzima súper-óxido dismutasa (SOD) y el contenido de malondialdehído (Li *et al.* 2006). Los mecanismos de inducción involucrados en la activación de la producción de polifenoles provocada por la adición de estroncio 10 mM en el medio de cultivo de *T. suecica* es un área de interés para ser investigada en el futuro.

3.2 INDUCCIÓN DE MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN *T. SUECICA* A TRAVÉS DEL ESCALADO DEL CULTIVO Y LA ADICIÓN DE ESTRONCIO

3.2.1 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (μ) DE *T. SUECICA* CULTIVADA EN REACTORES DE 80 mL, 5 L Y 80 L

Una vez mejorado el cultivo a pequeña escala se pasó a escala mayor, utilizando el medio seleccionado siempre que fue posible, y se analizó la actividad antioxidante de los extractos obtenidos, dado el potencial que estos compuestos pueden tener en diversos sectores, como el médico y el alimentario.

Por una parte, el cultivo de *T. suecica* en reactores de 80 mL se realizó en el medio de cultivo control con diferentes concentraciones de nitrógeno (N-NO₃= 2, 4 y 8 mM). Los niveles más elevados de velocidad específica de crecimiento (μ) y densidad celular en la fase estacionaria del cultivo en *batch* se lograron con una concentración 4 mM de nitrógeno, como se muestra en la Fig. 1 del anexo 2. Por otra parte, también se realizaron cultivos de *T. suecica* en reactores de 80 mL y 5 L en el medio control como con adición de estroncio a concentración 10 mM. La μ y la densidad celular fueron más elevadas en el reactor de 80 mL que en el de 5 L y no se observó una diferencia importante en los cultivos con y sin estroncio (Fig. 2 del anexo 2). El escalado del proceso es el objetivo final de cualquier proceso biológico para la producción de metabolitos de interés industrial. Como se señaló anteriormente, también se realizó un cultivo en reactor de 80 L en el medio control con una concentración 4 mM de N-NO₃ (Fig. 3 del anexo 2), pero en este caso no se pudo realizar el cultivo con estroncio, ya que la alta concentración usada promovía la formación de un capa, probablemente de carbonato de estroncio, que taponaba los

orificios de salida del aire y la superficie del sensor de pH, por lo que no funcionaban adecuadamente y no fue técnicamente viable la realización de este cultivo. El objetivo del escalado del cultivo fue producir biomasa de *T. suecica* para estudiar su efecto en su potencial antioxidante.

Tanto la μ como la densidad celular se vieron afectadas significativamente por el escalado del cultivo, descendiendo su valor al pasar de 80 mL a 80 L, de 2 día^{-1} a 0.285 día^{-1} y de 8.0×10^6 a $4.9 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente. Es evidente que variables presentes en el escalado como la aireación y el estrés mecánico presentan una influencia decisiva en la densidad celular y la μ . Asimismo, la aireación fue disminuyendo con el incremento de volumen del bioreactor desde 3.5 a 0.056 vvm, en función de la capacidad del sistema. Falinsky *et al.* (2009) encontraron que la microalga *Isochrysis galbana* sufrió un daño celular al inicio de la aireación, pero a medida que incrementaba la transferencia de gas el crecimiento fue mayor. También, en reactores muy altos, puede existir un diferencial de presión, ya que en la parte inferior del reactor la presión sería más alta que en la parte superior y esto puede causar daño a las células de microalgas (Barbosa 2003).

Además, se evidenció un incremento en la productividad en un reactor de columna de burbujas al incrementar la aireación, lo que mejoró el mezclado y a su vez causó un movimiento continuo de las células desde la parte oscura del reactor a la periferia más iluminada asegurando una mayor incidencia de luz por célula (Sánchez-Mirón *et al.* 2003). Es probable que este fenómeno ocurriese en los reactores de 80 mL utilizados en este trabajo.

Adicionalmente, se intentó modelar el crecimiento microalgal mediante el ajuste a una ecuación logística. La fundamentación matemática de este tipo de sistemas biológicos permite establecer abstracciones entre los elementos reales de los sistemas y los componentes básicos del cálculo, lo que facilita la verificación de propiedades interesantes de los sistemas modelados y que redundará en un más fácil control del proceso. El modelo logístico aplicado se muestra en la ecuación 1, donde X es la biomasa (cel mL^{-1}) a un tiempo t (h), X_0 y X_{\max} ($\text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}$) son la concentración de biomasa inicial y máxima y μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + e^{\left[\ln \left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1 \right) - \mu t \right]}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Los datos experimentales se ajustaron al modelo logístico a través del software SigmaPlot 2001 versión 7.101 (SPSS Inc.) que usó el algoritmo de Marquardt-Levenberg para determinar los valores de los parámetros. Los valores que definen el modelo se presentan en la Tabla 1 del anexo 2. En todos los casos se comprobó un excelente ajuste de este modelo a los datos experimentales, como se desprende de los valores de los coeficientes de regresión obtenidos (muy próximos a uno), y los resultados confirman las conclusiones obtenidas previamente

3.2.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES Y DE SÓLIDOS EXTRAÍBLES TOTALES

Los valores promedio de sólidos extraíbles totales se presentan en la fig. 4a del anexo 2, y se expresan como mg de extracto por gramos de peso seco de biomasa (mg Ext·g⁻¹ DW). Tanto el volumen del reactor como el tipo de disolvente usado fueron factores significativos en los sólidos extraíbles totales. El orden descendente de la capacidad para extraer los sólidos solubles fue: metanol-agua>metanol>etanol. Esto demuestra que la mayoría de los sólidos extraíbles son compuestos de naturaleza polar. Por otra parte, en promedio, el orden decreciente de producción de sólidos extraíbles fue CR>CB>CT>SrB>SrT para todos los disolventes usados y en general, se obtuvieron más sólidos extraíbles en los cultivos control que en los cultivos con estroncio (Fig. 4a del anexo 2). Esta tendencia indica que este metal tiene un efecto negativo en los sólidos extraíbles, independientemente del disolvente de extracción usado, y esto puede ser debido a que el estroncio fue asimilado, incrementando el contenido mineral de la célula y disminuyendo el contenido orgánico (Ulloa *et al.* 2011b), que es el que finalmente es soluble en los disolventes utilizados. En este sentido, la adición de concentraciones elevadas de estroncio al medio de cultivo de *Platymonas (Tetraselmis) subcordiformis* disminuyó el contenido de clorofila a y clorofila b. La pérdida del contenido de clorofila se pudo deber a la peroxidación de las membranas de los cloroplastos de la microalga (Li *et al.* 2006). Por otra parte, el escalado del cultivo también supuso una mejora del

rendimiento de sólidos extraíbles en *T. suecica*, pues a mayor volumen del reactor mayor es el contenido de sólidos extraíbles.

Los mejores rendimientos de extracción de los sólidos obtenidos en este trabajo (34%) fueron similares a los obtenidos por digestión enzimática de *T. suecica* (23 a 36%) tras utilizar diferentes carbohidrasas (Hajimahmoodi *et al.* 2010). Además, en la actualidad se están desarrollando nuevos métodos para la preparación de extractos de microalgas, como por ejemplo, la extracción con líquidos presurizados (PLE) que bajo ciertas condiciones logran hasta un 40% en el rendimiento de sólidos extraíbles (Lee *et al.* 2009; Cha *et al.* 2010).

Los valores promedio de los polifenoles totales presentados como equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco de biomasa ($\text{mg GAE} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$) se presentan en la Fig. 4b del anexo 2. En los reactores de 5 y 80 L (CB y CR) se obtuvo el mayor contenido de polifenoles totales tanto para el extracto preparado con metanol como con etanol. Además, se debe tener en cuenta que el estroncio no tuvo un efecto negativo en el contenido de polifenoles en los cultivos de 80 mL (SrT y CT), pero sí lo tuvo en el cultivo en 5 L (SrB y CB).

La eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos de la microalga se correlaciona con la polaridad del disolvente usado y se presenta en orden decreciente: etanol>metanol>metanol-agua. Esta secuencia fue inversa a la observada para sólidos extraíbles; así, la cantidad de polifenoles totales en los extractos metanol-agua fue la tercera parte de lo encontrado en los extractos etanólicos. Además, el escalado del cultivo tuvo un efecto positivo en los polifenoles, pues el mayor contenido de polifenoles totales se logró en CB y CR usando etanol o metanol para la extracción (Fig. 4b del anexo 2).

En base a lo anteriormente expuesto, se demuestra que la composición de la microalga se ve afectada por el sistema de cultivo usado y por la composición del medio, aunque se fue cuidadoso en mantener constantes parámetros como la intensidad de iluminación y el control del pH. Sin embargo, se ha demostrado que las condiciones de cultivo son la clave para mejorar la productividad y controlar la composición bioquímica de la biomasa de microalgas (Fábregas *et al.* 2001). Por otra parte, el contenido de polifenoles totales en los extractos metanólicos y etanólicos

obtenidos en este trabajo fue mayor que el obtenido por medio de digestión enzimática de *T. suecica*, cuyo valores oscilaron entre 1.7 a 2.8 mg g⁻¹ de biomasa (Lee *et al.* 2009).

3.2.3 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

A) CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL RADICAL DPPH

Los resultados de la inhibición del DPPH se muestran en la figura 5a del anexo 2. La máxima inhibición del DPPH se logró en los extractos CB y SrB de *T. suecica* usando metanol-agua en su preparación (81.9 ± 2.5 y 80.2 ± 1.7). Este resultado no concuerda con el bajo contenido de polifenoles encontrados en el mismo tratamiento (Fig. 4b del anexo 2), lo cual indica que los polifenoles no fueron los únicos responsables de la inhibición del DPPH. Sin embargo, el coeficiente de correlación entre el % de inhibición del DPPH y el contenido de polifenoles fue alto y significativo para los extractos metanólicos y metanol-agua (Tabla 2 del anexo 2).

En este sentido, Hajimahmoodi *et al.* (2010) encontraron un coeficiente de correlación pequeño entre estas variables para extractos de microalgas. Por el contrario, en algunas macroalgas se ha encontrado una correlación significativa entre la inhibición del DPPH y el contenido de polifenoles (Jiménez-Escrig *et al.* 2009). También se han encontrado en la literatura valores de hasta 71% de inhibición del DPPH en extractos de *T. suecica* preparados por digestión enzimática (Lee *et al.* 2009) así como alrededor de un 100% de inhibición en una fracción acuosa a partir de una extracción secuencial con hexano, acetato de etilo y agua de *Chlorella vulgaris* (Hajimahmoodi *et al.* 2010). Se ha demostrado que otros componentes celulares como las proteínas, ácidos grasos poliinsaturados y algunos pigmentos tienen cierta actividad antioxidante (Lee *et al.* 2009). En este trabajo, el mejor disolvente para la extracción fue la mezcla metanol-agua porque su extracto mostró el mayor porcentaje inhibición de DPPH (80%). Se concluye que la biomasa de *T. suecica* puede ser una buena fuente natural de extractos antioxidantes.

B) CAPACIDAD DE DECOLORACIÓN DEL RADICAL ABTS^{•+}

La capacidad antioxidante de los extractos de la microalga se analizó por el método TEAC (Capacidad antioxidante equivalente al TROLOX), expresando los

resultados como mM equivalentes de Trolox (Fig. 5b del anexo 2). Los resultados indicaron que el equivalente de la concentración en Trolox de las muestras extraídas con metanol fueron las mejores y estadísticamente iguales, excepto para el tratamiento de SrB, cuyos resultados fueron los peores. Además, esas capacidades antioxidantes fueron independientes del volumen del cultivo, aunque el disolvente usado fue un factor muy importante.

Cabe resaltar que el tratamiento CB con metanol-agua (Barra blanca de la figura 5b del anexo 2) mostró un valor estadísticamente igual al obtenido por el extracto metanólico. Como una explicación a esta observación, se puede hacer notar que el contenido de polifenoles, en el tratamiento mencionado anteriormente, obtenido con metanol-agua, fue mucho mayor que los otros extractos obtenidos con el mismo disolvente (Fig. 4b, símbolo triangular). Por otra parte, la presencia de estroncio en el tratamiento SrB con metanol fue un factor negativo porque su TEAC fue significativamente menor que el tratamiento CB con metanol. Sin embargo, este hecho no fue consistente con los tratamientos CT y SrT usando metanol porque el estroncio no tuvo efecto en la actividad antioxidante de esos sistemas.

Además, el coeficiente de correlación entre los valores del TEAC y el contenido de polifenoles para los extractos cuando se usó metanol y metanol-agua fue alto y significativo ($P \leq 0.01$) (Tabla 2 del anexo 1). Estos resultados indicaron que los compuestos polifenólicos fueron las principales moléculas involucradas en la respuesta de la capacidad antioxidante medida como valores TEAC. En otras microalgas se encontró que esta correlación fue muy baja usando diferentes disolventes como hexano, acetato de etilo y agua (Li *et al.* 2007) y por ejemplo, en *Chlorella vulgaris*, el 50% del total del potencial antioxidante (actividad TEAC) se atribuyó a moléculas como carotenoides y clorofilas, específicamente luteína, clorofila *a* y *b* y feofitina *a*, que fueron los antioxidantes más abundantes en los extractos y además, el 23% de la actividad antioxidante fue atribuida al contenido de compuestos hidrofílicos que no han sido identificados todavía (Cha *et al.* 2010).

Sin embargo, la variedad en la composición bioquímica y en la capacidad de las microalgas para producir un amplio rango de compuestos antioxidantes es la base de

la diversidad en la actividad antirradical (Li *et al.* 2007), además de las condiciones de cultivo.

C) BLANQUEAMIENTO DEL β -CAROTENO

La actividad protectora del blanqueamiento del β -caroteno fue expresada como el coeficiente de actividad antioxidante (AAC) y los resultados se muestran en la Fig 5c del anexo 2 en los que ambos factores “volumen del reactor” y “tipo de disolvente” fueron significativos ($P \leq 0.01$). Los valores altos de AAC se obtuvieron en CB y CR usando como disolvente el etanol, seguido por el metanol y finalmente por la mezcla metanol-agua.

Los extractos obtenidos de los tratamientos SrT y SrB mostraron un valor de AAC significativamente menor que las muestras de CT y CB que fueron extraídos con etanol y metanol. Estos resultados indican que el estroncio podría estar involucrado en mecanismos que permiten la biosíntesis de metabolitos secundarios causantes de estrés celular. Sin embargo, los mejores coeficientes de actividad mostrados por *T. suecica* fueron muy pequeños comparados con los coeficientes mostrados por *Chlorella vulgaris* (AAC=25000) y otras microalgas (Rodríguez-García y Guil-Guerrero 2008).

El coeficiente de correlación entre el β -caroteno y el contenido de polifenoles en los extractos metanólicos y etanólicos fue significativamente alto ($P \leq 0.01$) (0.86 y 0.77, respectivamente) (Tabla 2 del anexo 2), por lo que esta actividad se atribuye al contenido de polifenoles en el extracto de *T. suecica*. También, extractos de *Tetraselmis tetrathele* y otras microalgas fueron activos en la inhibición de la peroxidación de lípidos, lo que lleva a pensar en la presencia de compuestos bioactivos. Asimismo, extractos etanólicos de *Spirulina máxima* mostraron un incremento significativo en el contenido de compuestos fenólicos que condujo a una progresiva protección de la peroxidación de lípidos (Natrah *et al.* 2007; Abd El-Baky *et al.* 2009).

Contrariamente a los ensayos antirradicales, en el blanqueamiento del β -caroteno, las moléculas con capacidad de prevenir la peroxidación de lípidos son menos polares ya que los extractos metanólicos fueron los más activos; y tal vez sean

compuestos lipofílicos los que actúan, como los pigmentos, esteroides, ácidos grasos, entre otros. Por otra parte, la adición de estroncio al medio de cultivo no fue significativa con respecto al medio control. Es conocido que la presencia de altas concentraciones de metales con respecto al medio control puede causar estrés en las células (Li *et al.* 2006) y por esta razón se esperaría que la biomasa cultivada en un medio rico en estroncio exhibiese mayor actividad antioxidante que la obtenida en este trabajo.

Se analizaron diversas variables para todos los tratamientos y una vez escalado el cultivo. Todos los extractos de la biomasa de *T. suecica* cultivada en reactores de 5 L fueron más activos en la actividad antirradical y en la protección de la peroxidación de lípidos, disminuyendo a menor y mayor escala de reactor. Los parámetros como la intensidad luminosa y el pH fueron controlados en los mismos valores en cada reactor, siendo la aireación el único parámetro diferente, hecho que demuestra su gran influencia en la actividad antioxidante.

El flujo de aire fue de 3.5 vvm, 1 vvm y 0.056 vvm en los reactores de 80 mL, 5 L y 80 L, respectivamente. En los reactores de 80 mL se alcanzó la máxima densidad celular, pero ésta disminuyó al incrementar el volumen del reactor, lo que puede deberse a la diferente aireación existente en cada sistema (Fábregas *et al.* 1994, Vega-Estrada *et al.* 2005). De este modo, se puede afirmar que la densidad celular está relacionada inversamente con la actividad antioxidante. Una alta aireación desplaza el oxígeno disuelto producido en la fase oscura de la fotosíntesis, evitando la acumulación de oxígeno y la inhibición del crecimiento de la microalga. También la presión diferente que existe a lo largo del reactor puede ser un factor que contribuye al estrés y en estas condiciones puede ocurrir que se induzca mayor actividad antioxidante en la biomasa. En este caso, el reactor de 80 L es un reactor muy alto (1.5 m) por lo que tendría una mayor presión en el fondo que en la parte superior, creando un diferencial de presión que puede originar estrés celular (Barbosa 2003).

En sistemas ligeramente aireados con suplementación de CO₂, el oxígeno disuelto producido por la actividad fotosintética fue alto (Fábregas *et al.* 1994). Además, altos niveles de oxígeno disuelto en los cultivos de microalgas inhiben la

fotosíntesis (Contreras-Flores *et al.* 2003) pudiendo causar la producción de sustancias reactivas de oxígeno, que promuevan la alta actividad antioxidante en la microalga.

Dado que los distintos métodos para evaluar la actividad antioxidante pueden conducir a diferentes resultados, también se evaluó el poder antioxidante por otras dos vías, la reducción del hierro (FRAP) y la actividad de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), el primero es un método antirradicalario y el segundo de peroxidación de lípidos. Cabe mencionar que los resultados de éstos métodos no se incluyen en el anexo 2, por lo que a continuación se presentan las Figuras, su explicación y discusión de los resultados en ellas plasmados.

D) PODER ANTIOXIDANTE DE LA REDUCCIÓN DEL HIERRO (FRAP)

El ensayo FRAP se puede aplicar a extractos acuosos y alcohólicos, y se basa en reacciones de transferencia de electrones, determinando la actividad antioxidante por la habilidad del extracto para reducir el Fe (III) a Fe(II), formando un complejo de color azul intenso de $((\text{Fe(II)TPTZ}_2)^{+2})$ (Wang *et al.* 2010). En todos los cultivos llevados a cabo en la presencia de estroncio, la producción de compuestos con habilidad para reducir el Fe (III) fue inhibida, como lo prueba el hecho de que la actividad fue mayor en la biomasa cultivada en el medio control (Fig. 3.2). Los resultados del FRAP en este trabajo fueron más prometedores que los reportados para otras microalgas (Hajimahmoodi *et al.* 2010), y de acuerdo con la clasificación establecida por Wong *et al.* (2006) basada en la actividad antioxidante, los extractos metanólicos de *T. suecica* tuvieron una alta actividad antioxidante porque los resultados del FRAP estuvieron en el rango de 100 a 500 $\mu\text{mol Fe (II)}$ calculado por cada gramo de biomasa seca, aunque estos valores fueron menores que los obtenidos con los extractos de *Chlorella vulgaris* (Wang *et al.* 2010).

El coeficiente de correlación entre el FRAP y el contenido de polifenoles fue alto para los extractos metanólicos ($R^2=0.97$) y metanol-agua ($R^2=0.89$), por lo que la actividad antioxidante se atribuye principalmente a los polifenoles presentes en el extracto. Esta correlación fue significativa ($R^2=0.76$ como máximo) en otras microalgas (Hajimahmoodi *et al.* 2010), pero siempre menor a la obtenida en este estudio con *T. suecica*.

E) SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Este método se utiliza para evaluar la protección en la peroxidación de lípidos, y se sigue la formación de malondialdehído (MDA) que se forma como resultado de la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados (Shahidi y Zhong 2005).

A través de la evaluación del contenido de MDA se determinó el efecto protector de los extractos de microalga en el proceso de oxidación de lípidos. En este sentido, los resultados muestran que el contenido de MDA fue similar en la biomasa cultivada con y sin estroncio en los reactores de diferente volumen (Fig. 3.3), lo cual indica que el volumen de reactor y la presencia de estroncio en el medio de cultivo no fueron significativos en la producción de compuestos con actividad protectora de la oxidación de lípidos. Se concluye que los compuestos con esta actividad son más solubles en metanol, porque estos extractos mostraron una mayor inhibición en la formación de MDA.

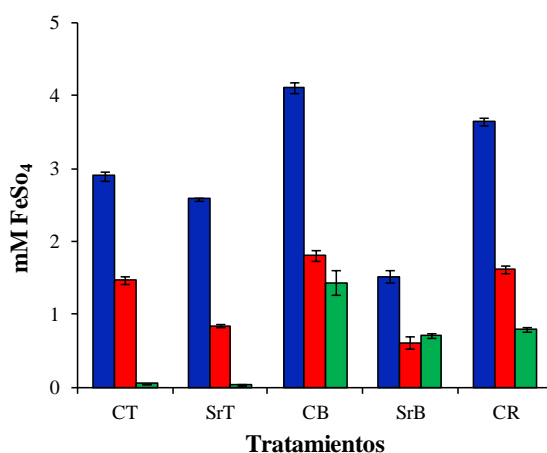


Figura 3.2. Poder antioxidante de la reducción de Fe (III) (FRAP) de *T. suecica* cultivada en reactores de diferente volumen con y sin adición de estroncio. Extractos preparados con metanol (■), etanol (■) y metanol-agua (■).

También se deduce de esta prueba que los polifenoles no fueron los principales promotores de la actividad porque el coeficiente de correlación ($R^2=0.02$) es considerablemente bajo. Sin embargo, en los extractos etanólicos, la actividad protectora, aunque menor, fue debida al contenido de polifenoles con un coeficiente de correlación alto ($R^2=0.83$) y con pendiente negativa. Otros autores han referenciado que los extractos metanólicos de *T. tetrahele* y otras microalgas fueron

activos en la inhibición de la oxidación de lípidos (Natrah *et al.* 2007). También en extractos etanólicos de *Spirulina máxima* se encontró una disminución significativa en los niveles de MDA, que se relacionó con el incremento en la concentración de compuestos fenólicos (Abd El-Baky *et al.* 2009).

3.2.4 CONTENIDO DE CAROTENOIDES Y α -TOCOFEROL EN *T. SUECICA*

Como se mencionó anteriormente, las moléculas responsables de la actividad antioxidante en microalgas pueden ser pigmentos y esteroides, y por ello se analizó el contenido de pigmentos totales en la biomasa de *T. suecica*, siendo la fucoxantina y el β -caroteno los principales. Se observó que el sistema de cultivo afectó al contenido y la variedad de los pigmentos; en este sentido, el máximo contenido de clorofila y carotenoides se obtuvo en la biomasa de CR seguida por CB y CT (Tabla 3 del anexo 2).

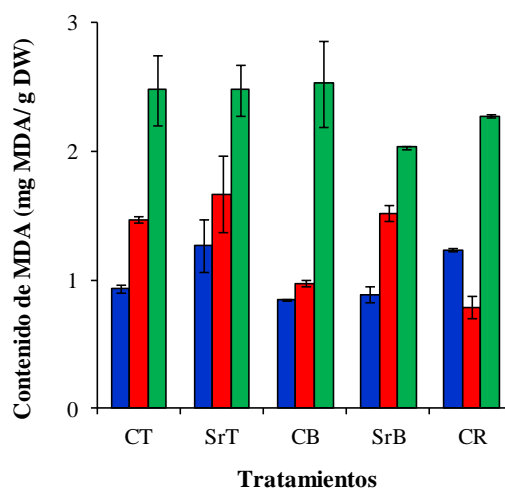


Figura 3.3 Contenido de MDA en biomasa de *T. suecica* cultivada en reactores de diferente volumen con y sin adición de Sr. Extractos preparados con metanol (■), etanol (■) and metanol-agua (■).

En este caso, la adición de estroncio afectó negativamente el contenido de pigmentos totales, mostrando el contenido más bajo de clorofila total y carotenoides totales, pero el contenido de fucoxantina y β -caroteno fue mayor en la biomasa cultivada en presencia de estroncio.

El contenido de pigmentos puede explicar la alta actividad antioxidante de algunos extractos que mostraron una pequeña correlación con el contenido de

polifenoles. Se ha demostrado que algunas especies de microalgas presentan una actividad antioxidante considerable, representando una potencial fuente natural de compuestos con esta propiedad. Además, la ventaja de producir este tipo de compuestos a partir de microalgas es que su composición va a estar influenciada en gran medida por las condiciones de cultivo, lo que puede suponer una herramienta útil para su control.

En este trabajo se demostró que la variación en el volumen del reactor tuvo un gran impacto tanto en la actividad antioxidante como en el contenido de polifenoles de la biomasa. En este sentido, otra microalga como *Phaedactylum tricornotum* se cultivó en diferentes biorreactores con la misma forma y volumen pero con diferentes corrientes de flujos de aire, y ello provocó la variación de la productividad, la densidad celular y la composición de ácidos grasos (Fernández *et al.* 2004). También se ha demostrado que las diferentes tasas de renovación del cultivo, concentración de nutrientes y fuentes de carbono afectaron el crecimiento y la composición de algunas microalgas como *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus almeriensis*, *Haematococcus pluvialis* (Fábregas *et al.* 2000, Otero y Fábregas 1997, Sánchez *et al.* 2008).

La presencia de metales en el medio de cultivo es necesaria para la microalga, pero cuando están en exceso puede generar estrés oxidativo por la producción de especies reactivas de oxígeno a través de sus efectos tóxicos sobre la fotosíntesis y, por lo tanto, graves daños a las macromoléculas. Por esta razón, se esperaba que el exceso de estroncio (10 mM) añadido al medio de cultivo indujera en *T. suecica* altos niveles de actividad antioxidante (Morelli y Scarano 2004).

Por otra parte, el contenido de α -tocoferol fue menor en la biomasa cultivada en presencia de estroncio. También, se debe mencionar que el contenido de pigmentos y tocoferol fue más alto en la biomasa de CR (el mayor volumen ensayado) que en el resto de tratamientos. Por tanto, se recomienda trabajar a gran escala para el cultivo de *T. suecica* cuando se quiere inducir la producción de esos metabolitos.

3.3 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS EXTRACTOS DE *T. SUECICA*

Para comprobar la presencia de polifenoles e identificarlos en los extractos de la microalga, se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas. Se analizaron los extractos del cultivo control del reactor de 80 L que fue la condición en la que se obtuvo la mayor actividad antioxidante y el mayor contenido de polifenoles. En la Fig. 3.4 se observa el mismo pico 1 en el cromatograma para los extractos con metanol, etanol y metanol:agua (50%), variando solamente la intensidad de la señal para cada muestra. Así también se observa que en el extracto con metanol:agua sale un pico importante alrededor de los 6 min, corroborando que la diferencia de actividad antioxidante obtenida con este extracto podría deberse a este compuesto, que por su tiempo de retención muy corto indica que posiblemente es pequeño y de naturaleza polar.

También cabe destacar que el extracto etanólico es el único que presenta un pico de gran intensidad a los 29 min, que es casi imperceptible en los otros 2 extractos, y otros de baja intensidad entre los 30 y 36 min, coincidiendo algunos de ellos con los extractos con metanol y metanol:agua.

Una vez identificadas las diferencias en el cromatograma, el extracto metanol:agua (con el que se obtuvo la mayor inhibición del DPPH) se analizó en un HPLC-masas para tratar de identificar los compuestos correspondientes a los picos de mayor intensidad.

En la Fig. 3.5 se muestra el TIC de masas en donde se observan picos importantes entre los 4 y 6.5 min y otros entre los 25 y 30 min. De ellos, se muestran posteriormente los espectros de masas correspondientes a cada pico, que llevan a la

identificación de los compuestos que emiten la señal en base a la comparación con la base de datos NIST.

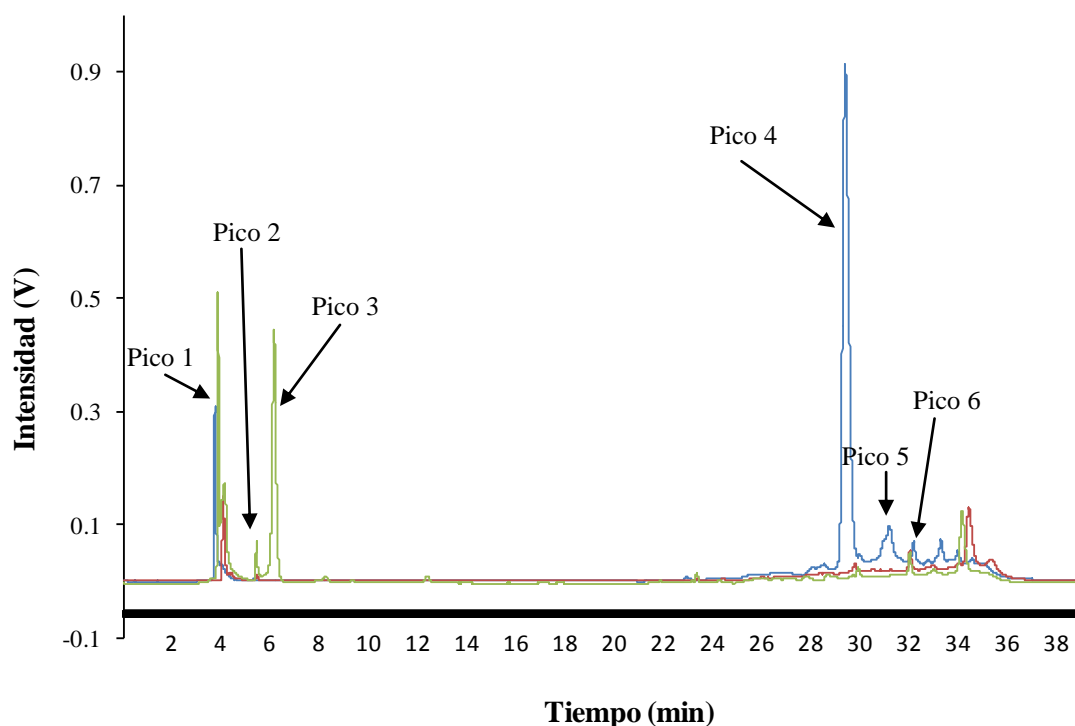


Figura 3.4 Cromatograma de polifenoles de los extractos metanol (—), etanol (—) y metanol:agua (—) a $\lambda=280$ nm en HPLC (UV).

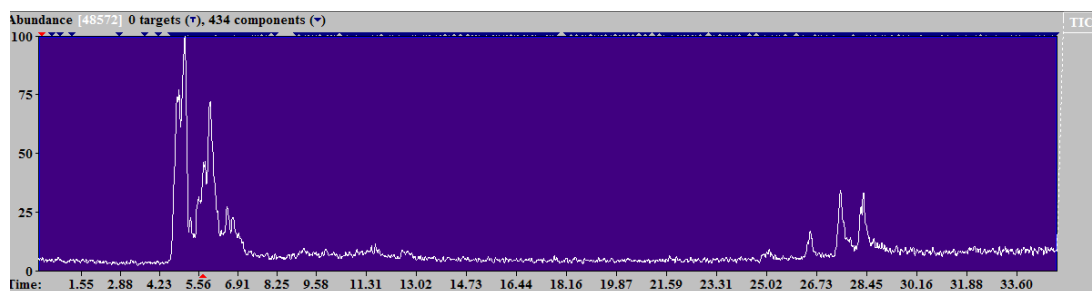


Figura 3.5 TIC de masas del extracto metanol:agua de la biomasa de *T. suecica* cultivada en CR

Del pico 1 del cromatograma (ver Fig. 3.4 para todos los picos que se describen) se obtiene el espectro de masas (Fig. 3.6) donde los fragmentos corresponden presumiblemente al compuesto β -Alanina N-(2metilbenzoil)-etil éster con un peso molecular (MW) de 235 y cuya fórmula es $C_{13}H_{17}NO_3$

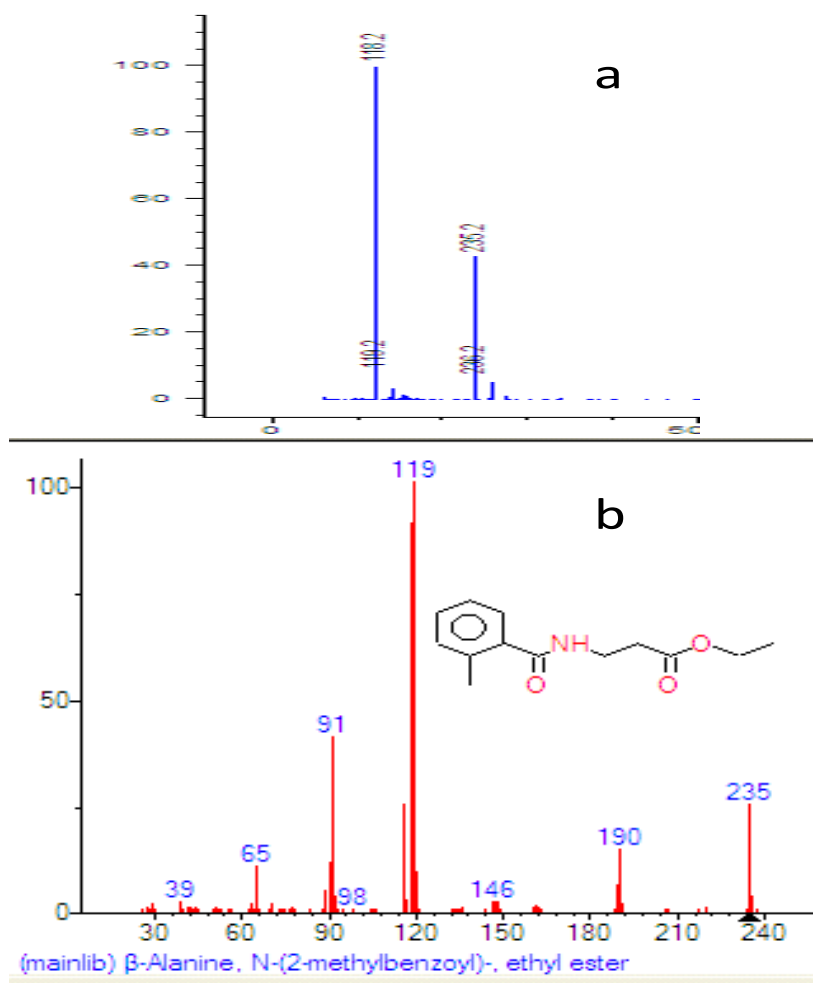


Figura 3.6 a) Espectro de masas más abundantes correspondiente al pico 1 del cromatograma del extracto de *T. suecica*, y b) Espectro de masas del éster etílico de la β-Alanina N-(2metilbenzoil) de la base de datos NIST.

Así mismo, se logró la identificación del compuesto más abundante en el pico 2 del cromatograma (Fig. 3.7), donde se observa que los fragmentos de masa más abundante son de 105 y 269 correspondiendo, según la comparación con la base de datos NIST, a N-(2-fenil etil)(3(E),6(Z),8(E)-decatrienamida con fórmula $C_{18}H_{23}NO$.

Una de las propuestas para la identificación del pico 3, en base a su espectro de masas es que corresponda al éster metílico del ácido 2, 5-hexadecanoico, 2 metil, 3 benzofuranil (Fig. 3.8).

El pico 4 podría corresponder a algún derivado del caroteno por su peso molecular y tiempo de retención (Fig. 3.9), que aunque no es uno de los pigmentos principales en esta microalga, se ha demostrado su presencia en *T. suecica* (Ulloa *et al.* 2011c).

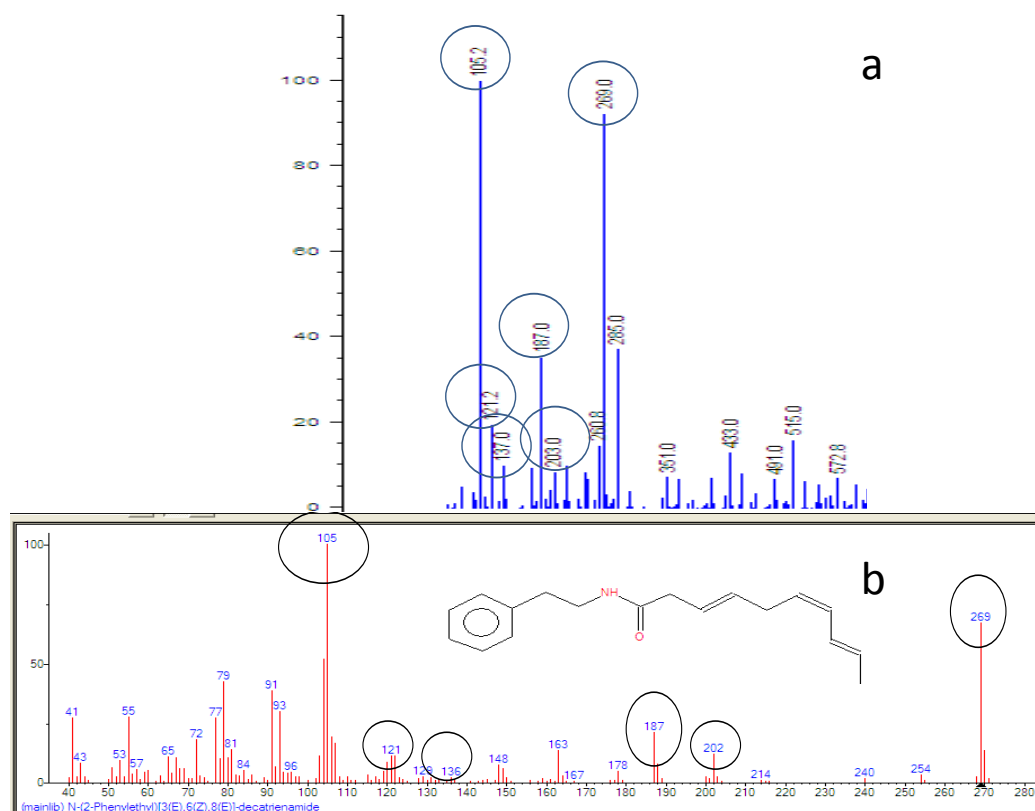


Figura 3.7 a) Espectro de masas más abundantes correspondiente al pico 2 del cromatograma del extracto de *T. suecica*, y b) Espectro de masas de la N-(2-fenil etil)(3(E),6(Z),8(E)-decatrienamida de la base de datos NIST.

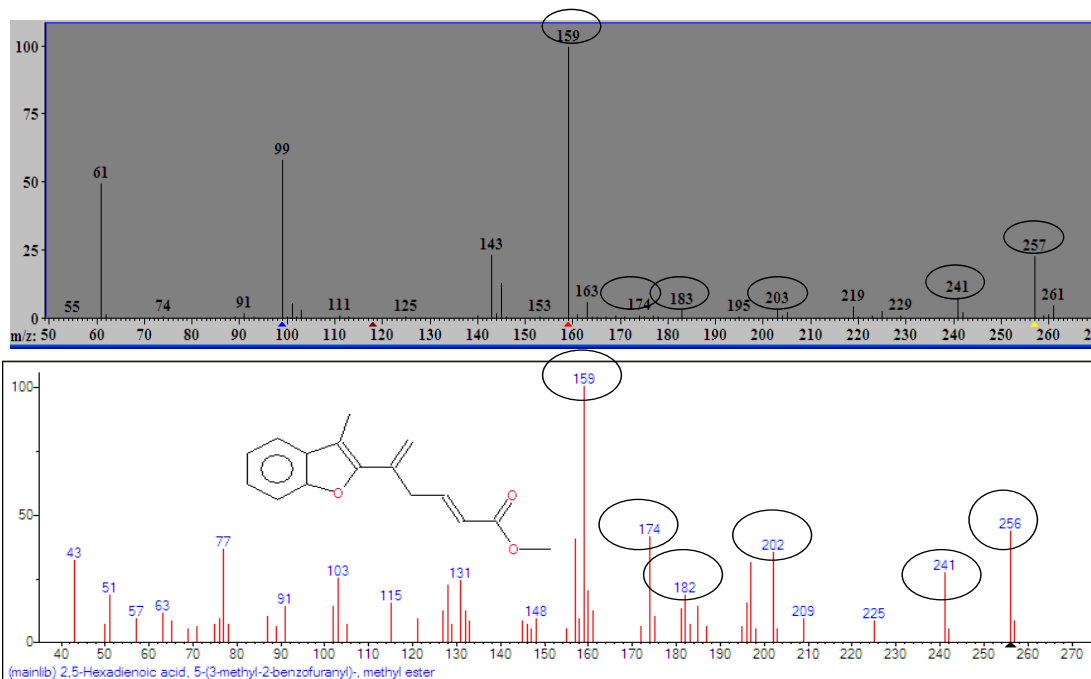


Figura 3.8 Espectro de masas más abundantes correspondiente al pico 3 del cromatograma del extracto de *T. suecica*, y b) Espectro de masas del ácido 2, 5-hexadecanoico, 2 metil, 3 benzofuranil de la base de datos NIST.

Los picos 5 y 6 corresponderían a esteroides como el campesterol (Fig. 3.10) y el 24-metilen-colesterol (Fig. 3.11), que por comparación con los espectros de masas publicados por Sánchez *et al.* 2004 (utilizando el mismo método de extracción y similares condiciones cromatográficas), y que además ya se ha demostrado que están presentes en *T. suecica* (Fábregas *et al.* 1997).

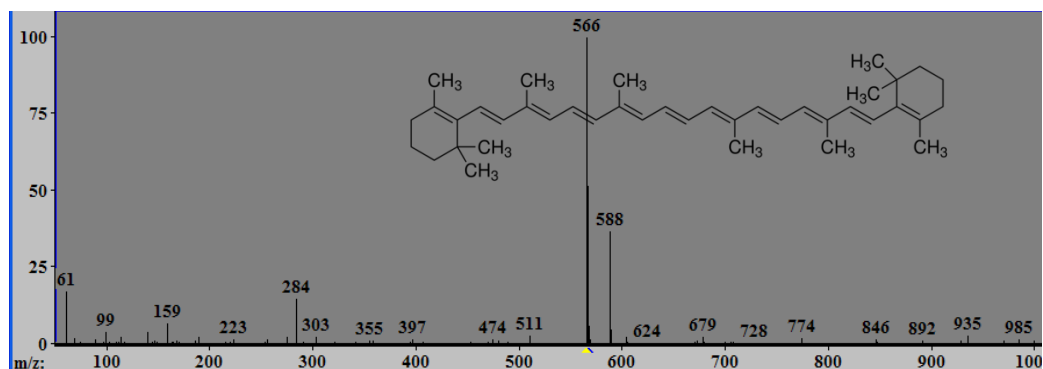


Figura 3.9 Espectro de masas más abundantes correspondiente al pico 4 del cromatograma del extracto de *T. suecica* y b) Espectro de masas del β -caroteno de la base de datos NIST.

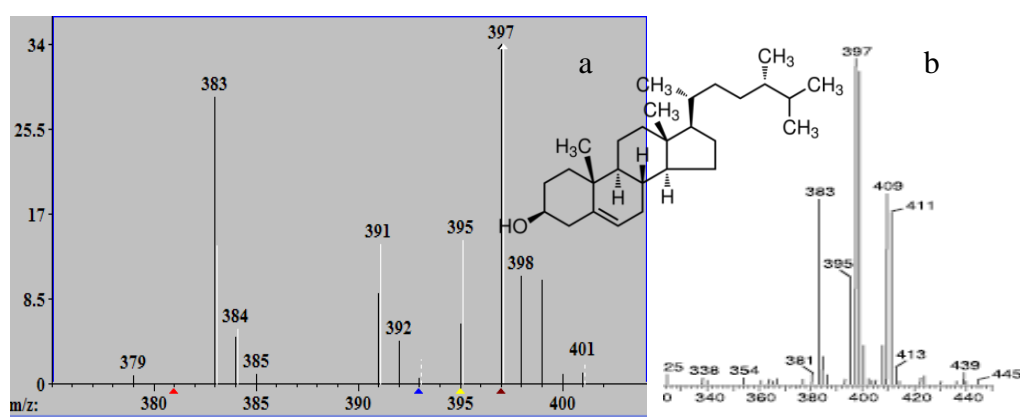


Figura 3.10. a) Espectro de masas más abundantes correspondiente al pico 5 del cromatograma del extracto de *T. suecica* y b) Espectro de masas del campesterol identificado por Sánchez *et al.* 2004.

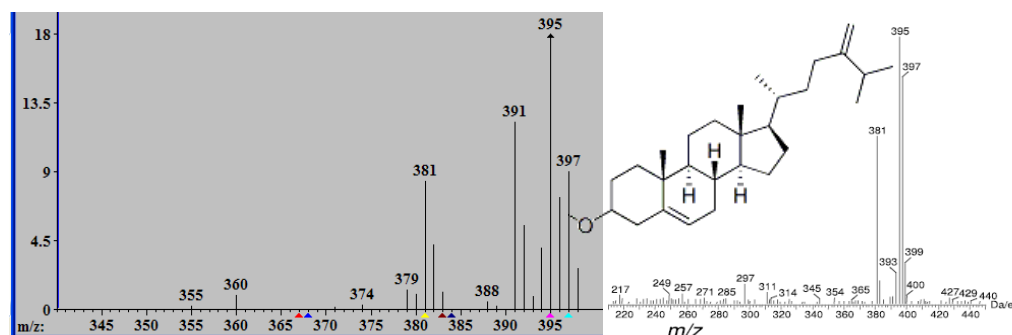


Figura 3.11. Espectro de masas más abundantes correspondiente al pico 6 del cromatograma del extracto de *T. suecica* y b) Espectro de masas del 24-metilen-colesterol identificado por Sánchez *et al.* 2004.

Así en *Spirulina platensis* se han encontrado compuestos fenólicos derivados del ácido benzoico, hidroxibenzaldehidos y derivados de ácidos cinámicos, además de tocoferoles como la vitamina E que presentan actividad antioxidante (Plaza *et al.* 2009). También en esta misma microalga, Mendiola *et al.* (2005) encontraron espectros característicos y comportamiento cromatográfico que sugieren la presencia de fenoles simples C₆-C₁ o esqueletos C₆. Por otra parte, en la microalga de agua dulce *Haematooccus pluviales* también se identificaron compuestos fenólicos “clásicos” como el carvacol, y los ácidos p-hidroxibenzoico, gálico, sirínico, vanílico, protocatéquico, sinápico, ferúlico, cafeico y clorogénico.

Por otra parte, está publicado el contenido de polifenoles totales en *T. suecica* (Lee *et al.* 2009), pero no su caracterización y con los resultados obtenidos en este trabajo se muestra que los compuestos fenólicos que posee no han sido referenciados para otras microalgas.

3.4 PROCESO DE EXTRACCIÓN NO CONVENCIONAL DE COMPUESTOS ACTIVOS DE *T. SUECICA*

3.4.1 EFECTO DE SURFACTANTES EN LA LISIS CELULAR DE *T. SUECICA*

Dado que hoy día se buscan procesos de extracción cada vez más eficientes y sostenibles ambientalmente, en esta etapa del trabajo se ha tratado de obtener los compuestos activos de microalgas a través de un proceso de extracción basado en los sistemas acuosos bifásicos (ATPS), utilizando sales y diversos surfactantes. Los resultados obtenidos son prometedores y ya han sido publicados.

En primer lugar, se llevará a cabo un *screening* del posible efecto lítico de diversos surfactantes en células liofilizadas de la microalga *Tetraselmis suecica*. Dado que los efectos biológicos de los surfactantes dependen de su estructura y concentración, se seleccionaron Tween 20, Tween 40, Tween 80, Tritón X-100, Tritón X-102 y Tritón X-114 como modelos de compuestos de superficie activa extensamente usados en procesos biológicos. Con la finalidad de estudiar el efecto del surfactante y su concentración en las células de microalgas, algunas muestras se analizaron por microscopía. Los resultados obtenidos para las mezclas conteniendo las células de microalga tras dos días de contacto con los surfactantes seleccionados se presentan en la tabla 1 del anexo 4.

En comparación con la muestra control (agua sin surfactante), se observó un mayor efecto lítico de las muestras de *T. suecica* tratadas con la serie Triton, lo que podría facilitar la liberación de su contenido antioxidante. Un hallazgo similar fue encontrado para células bacterianas, donde los lípidos de membrana fueron

completamente solubilizados en la presencia de un Tritón (Martins *et al.* 2010). También se puede afirmar que no existen diferencias significativas al variar la concentración (0.1, 1 y 5%).

El balance hidrofílico-lipofílico (HLB) es un parámetro útil habitualmente empleado para evaluar las propiedades estructurales de un surfactante determinado. Éste es un número empírico, en el cual los valores varían entre 0 y 20. De acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 1 del anexo 4, se puede concluir que la serie Tritón posee valores bajos de HLB, lo cual puede indicar una mayor interacción entre los lípidos de la membrana de las células de la microalga y los surfactantes más hidrofóbicos. Atendiendo a esta consideración, resulta lógico entonces que el el Tritón X-114 sea el candidato con mayor efecto lítico, ya que es el que presenta un valor de HLB más bajo. Este hecho ya fue referenciado en microorganismos procariotas y eucariotas (Bernot *et al.* 2005; Deive *et al.* 2011b), ya que la utilización de surfactantes más hidrofóbicos facilitaría su incorporación en la bicapa de fosfolípidos.

El efecto lítico se puede observar claramente en la Fig. 1 del anexo 4, al comparar las células liofilizadas después de un tratamiento con ultrasonido y Tritón X-114 (Fig. 1d y 1f del anexo 4) con las muestras iniciales (Fig. 1a y 1e del anexo 4).

3.4.2 FORMACIÓN DE SISTEMAS ACUOSOS BIFÁSICOS (ATPS)

A) EFECTO DE SALES INORGÁNICAS DE SODIO

Una vez demostrada la viabilidad del efecto lítico con surfactantes, se procedió a estudiar la segregación de fases provocada por sales inorgánicas. Hasta la fecha, no hay información referida a la aplicación de ATPS basados en surfactantes como alternativa a los métodos convencionales que usan compuestos orgánicos volátiles. La información que proporcionan los diagramas de fases será crucial para permitir evaluar la conveniencia de una sal determinada para actuar como inductor de la segregación de fases. Se observó que, de todos los sistemas ensayados, únicamente el Tween 20 y el Tritón X-102 dieron lugar a una formación de fases efectiva. En las tablas 1 y 2 del anexo 3, se muestran los datos de solubilidad en composición másica para las mezclas ternarias de {Surfactante (Tween 20 o Triton X102) + sal (Na_2CO_3 , Na_2SO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Na_2SO_3 , Na_2HPO_4 , NaCH_3COO) + H_2O } a

$T=298.15$ K y presión atmosférica y su comparación se muestra en las figuras 1 a 4 de dicho anexo. En estas gráficas se muestra información acerca de la concentración de los componentes requeridos para la formación de las 2 fases y su concentración en las fases superior e inferior. Cabe señalar que existe poca información disponible en la literatura acerca de los datos de solubilidad de ATPS basados en surfactantes y ésta es la primera vez que se investigan estos sistemas.

Como se puede observar, se pueden concluir tendencias similares para ambos surfactantes. Así, las sales inorgánicas ensayadas muestran un efecto *salting out* similar: $\text{Na}_2\text{CO}_3 > \text{Na}_2\text{SO}_3 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 > \text{NaH}_2\text{PO}_4 > \text{NaCH}_3\text{COO}$.

Este comportamiento se puede explicar desde dos puntos de vista. Por una parte, la serie de Hofmeister los efectos iónicos específicos son ubicuos en química y muchos exhiben una tendencia recurrente denominada “serie de Hofmeister”. Esta serie clasifica los iones en función de su capacidad de cambiar la estructura del agua. Los efectos de estos cambios primero fueron estudiados y categorizados a finales del siglo XIX por Franz Hofmeister, en base a la fuerza de las sales en base a su capacidad para estructurar o desestructurar el agua. El mecanismo de la serie de Hofmeister no está enteramente claro, aunque los últimos estudios convergen hacia la idea de que los efectos de “*salting out*” o “*salting in*” están relacionados con la fuerza de las interacciones específicas entre los iones y las moléculas de agua. Así, mientras los iones “*salting out*” disminuyen la solubilidad de moléculas no polares, consolidando las interacciones hidrofóbicas, los iones “*salting in*” conllevarán un aumento de la solubilidad de moléculas no polares y del orden del agua, debilitando el efecto hidrofóbico (Zhang *et al.* 2006). Por lo tanto, se ha demostrado que la estructura del agua no es esencial para el efecto Hofmeister sino que existe una competición compleja entre la sal y el surfactante por las moléculas del agua así como interacciones específicas entre ellos (Xie *et al.* 2010, Han *et al.* 2010).

En el caso que se investiga en esta tesis,, en donde el catión siempre es el mismo (Na^+), se puede comprobar que la tendencia seguida por cada sal inorgánica es similar a la predicha por la serie de Hofmeister (Zhang *et al.* 2006).

Por otra parte, la habilidad de un anión para aumentar la hidrofobicidad de un surfactante, puede estar correlacionado con el número liotrópico del anión. En

general, la relación de hidratación, la relación carga-tamaño, la carga y el número liotrópico se pueden relacionar con la energía libre de Gibbs de hidratación ($D_{\text{hyd}}G$) para cada ión, la cual puede ser una herramienta útil para verificar cuantitativamente los resultados experimentales obtenidos. Considerando que la alta densidad de carga de las sales inorgánicas estudiadas comparten un catión común, pero que contienen diferentes aniones, es fácil ver que la capacidad *salting-out* de las sales, sigue el siguiente orden: CO_3^{2-} (-1315 kJ/mol) > SO_3^{2-} (-1295 kJ/mol) > SO_4^{2-} (-1080 kJ/mol) > H_2PO_4^- (-465 kJ/mol) > CH_3COO^- (-365 kJ/mol) (Marcus 1991). Esta tendencia confirma que los aniones con mayor capacidad de segregación de fases muestran valores de $D_{\text{hyd}}G$ más negativos.

De los datos obtenidos, se puede concluir que el uso de Tritón X-102 implica la formación de mayores regiones bifásicas para la mayor parte de las sales inorgánicas con alta densidad de carga estudiadas. Esto significa que es necesaria menos cantidad de sal para lograr la separación de las fases. El comportamiento observado también se puede explicar en base a los diferentes valores del balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de Tween 20 y Tritón X-102, los cuales son 16.7 y 14.4, respectivamente. Tradicionalmente, se considera que un mayor efecto caotrópico conducirá a grandes regiones inmiscibles, probablemente como resultado de la incompatibilidad entre los componentes que forman la mezcla. Siguiendo esta tendencia, estudios recientes (Deive *et al.* 2011a; Martins *et al.* 2010) también concluyeron que los compuestos más hidrofóbicos (líquidos iónicos y polietilenglicol) implican curvas binodales más cercanas al origen. Este efecto se puede explicar por la existencia de interacciones más favorables entre los iones de las sales orgánicas con las regiones polares del líquido iónico/surfactante/polímero. Los iones *salting out* presentan interacciones menos favorables con regiones no polares, lo que supone una mayor afinidad por el agua y por tanto una mayor habilidad de segregación de fases.

El siguiente paso en el trabajo consistió en el ajuste experimental de los resultados a un modelo matemático empírico desarrollado por Merchuck *et al.* (1998).

$$Y = A \exp\left\{\left(BX^{0.5}\right) - \left(CX^3\right)\right\} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde Y y X son la composición másica del surfactante y la sal inorgánica, respectivamente y A , B y C son los valores de los parámetros de ajuste, los cuales se muestran en la tabla 3 del anexo 3 con su respectiva desviación estándar (σ), la cual fue calculada con la siguiente expresión:

$$\sigma = \left(\frac{\sum_i^{n_{DAT}} (z_{exp} - z_{ajust})^2}{n_{DAT}} \right)^{1/2} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde los valores experimentales y teóricos se representan con Z_{exp} y Z_{ajust} y n_{DAT} es el número de datos experimentales. Observando los datos de desviaciones obtenidos, es posible concluir que la ecuación antes mencionada es apropiada para reproducir satisfactoriamente las curvas binodales de los sistemas estudiados.

Los datos de las rectas de reparto (TLs) fueron obtenidos por la regla de la palanca, teniendo en cuenta la relación entre la fase superior y la composición másica del sistema total.

$$Y_T = \frac{Y_F}{R} - \left(\frac{1-R}{R} \right) \cdot Y_B \quad (\text{Ec. 4})$$

$$X_T = \frac{X_F}{R} - \left(\frac{1-R}{R} \right) \cdot X_B \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde F , T y B representan la alimentación, la fase superior y la fase inferior, respectivamente; Y y X son la concentración del surfactante y la sal, respectivamente; y R es la relación medida con la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\text{Peso de la fase superior}}{\text{Peso de la mezcla}} \quad (\text{Ec. 6})$$

En paralelo, la información que proporciona la longitud de la recta de reparto (TLL), y la pendiente (S) de los datos de las rectas de reparto son herramientas útiles para determinar la distribución relativa del surfactante y la sal inorgánica entre las dos fases acuosas en equilibrio. Estos valores se calcularon por medio de las siguientes ecuaciones:

$$TLL = \left[(w_1^I - w_1^{II})^2 + (w_2^I - w_2^{II})^2 \right]^{0.5} \quad (\text{Ec. 7})$$

$$S = \frac{w_1^I - w_1^{II}}{w_2^I - w_2^{II}} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde están representadas la fracción másica en equilibrio del surfactante (1) y de la sal inorgánica (2), en la fase superior (I) y la fase inferior (II). Los datos de TL obtenidos para cada sistema ternario y los parámetros antes mencionados se muestran en la tabla 4 del anexo 3 y se representan en las figuras 3 y 4 del anexo 3.

De los resultados obtenidos, se puede concluir que existe una correlación entre el potencial *salting-out* de cada sal inorgánica de alta densidad de carga con la pendiente de las líneas de reparto. Por lo tanto, el uso de sales inorgánicas con alta densidad de carga con más capacidad *salting-out* como el Na_2CO_3 y Na_2SO_4 conlleva valores más altos de la pendiente y una segregación casi total del surfactante a la fase superior, un hecho coincidente con la información recientemente publicada por Deive *et al.* (2011a).

El siguiente objetivo consistió en un análisis de la consistencia de los datos experimentales de TL a través de la aplicación de Othmer- Tobias y las correlaciones de Bancroft (Othmer y Tobias, 1942) para cada ATPS:

$$\log\left(\frac{100 - w_1^I}{w_1^I}\right) = a + b \log\left(\frac{100 - w_2^{II}}{w_2^{II}}\right) \quad (\text{Ec. 9})$$

$$\log\left(\frac{w_3^{II}}{w_2^{II}}\right) = c + d \log\left(\frac{w_3^I}{w_1^I}\right) \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde a, b, c y d son los parámetros de ajuste, w es la fracción másica y los subíndices 1, 2 y 3 se refieren al surfactante, sal y agua, respectivamente; los superíndices I y II indican la fase rica en surfactante y la fase rica en sal, respectivamente. Estas correlaciones relacionan la concentración másica de ambas fases para obtener una función lineal. Los parámetros de ajuste y los coeficientes de regresión determinados en el presente trabajo se muestran en las tablas 5 y 6 del anexo 3. En base a los coeficientes de correlación obtenidos, las ecuaciones de

Bancroft y Othmer–Tobias, revelan un alto grado de consistencia con los datos experimentales lo que confirma la validez de esas correlaciones.

B) EFECTO DE SALES ORGÁNICAS DE SODIO

El siguiente aspecto a considerar fue la adición de sales orgánicas, citrato y tartrato sódico, como promotoras de la segregación de fases. Los resultados obtenidos se describen en la Fig. 2 del anexo 4. Nuevamente se usó el modelo matemático empírico desarrollado por Merchuk *et al.* (1998) y mostrado previamente en la ecuación 2, En base a los valores de desviación estándar (σ) presentados en el ESI del anexo 4 y a los ajustes presentados en la Fig. 2 del mismo anexo, se puede concluir que la ecuación antes mencionada es apropiada para describir las curvas binodales de forma satisfactoria.

Para una mejor visualización del efecto, se han presentado los datos conjuntamente con la sal inorgánica que dio lugar a mejores resultados, el Na_2CO_3 . Se puede observar, que nuevamente este anión es el que posee mayor capacidad de hidratación, disminuyendo así la cantidad de agua disponible para hidratar las moléculas de surfactante, como ya ha mencionado recientemente Deive *et al.* (2011a). Por otra parte, y debido a motivos medioambientales no es deseable introducir altas concentraciones de sales inorgánicas en los efluentes. Recientemente, algunos autores han usado citrato o tartrato como anión, en lugar de un anión inorgánico en ATPSs polímero-sal debido a su bio-degradabilidad y baja toxicidad. Se observa que el citrato sódico posee una mayor capacidad de formación de fases que el tartrato sódico, en concordancia con lo predicho por las serie de Hofmeister.

Adicionalmente, en la figura 3 del anexo 4 se muestran los valores de la *TLL* y la pendiente, calculados por medio de las ecuaciones 6 y 7. Se puede comprobar que existe una relación directa entre la concentración del surfactante en la fase superior y la *TLL*. Únale motivo es que el aumento de sal en el sistema provoca que la fase inferior sea cada vez más estructurada, lo que conduce a un mayor grado de transferencia del surfactante a la fase superior.

3.4.3 EXTRACCIÓN DE BIOMOLÉCULAS ANTIOXIDANTES

A) SISTEMA MODELO CON BIOMOLÉCULAS ANTIOXIDANTES

A tenor de los resultados expuestos previamente, se propondrá el Tween 20 y Tritón X-102 con carbonato de sodio, citrato de sodio y tartrato de sodio, como sistemas más adecuados para conseguir la separación de las tres biomoléculas representativas detectadas en las células de la microalga *T. suecica*: α -tocoferol, β -caroteno y ácido gálico. Esta evaluación se realizará en base a los resultados expresados como eficiencia de extracción E (%):

$$E(\%) = \left(\frac{m_i^{\text{surfactante}}}{m_i} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde $m_i^{\text{surfactante}}$ y m_i son el contenido másico del antioxidante en la fase superior y el contenido del antioxidante en el sistema total, respectivamente. Los valores de rendimiento de extracción de α -tocoferol, β -caroteno y ácido gálico para cada uno de los ATPS se muestran gráficamente en la Fig. 4 del anexo 4.

El rendimiento de extracción para α -tocoferol es elevado en todos los casos (superior al 97.7%), independientemente de la sal de sodio y el surfactante usado, como se concluye del análisis de varianza (ANOVA) ($P=0.32$ y $P=0.07$, respectivamente). Los resultados ANOVA indican que la selección de la sal juega un papel crucial en la extracción del ácido gálico en comparación con el surfactante ($P<0.001$ y $P=0.66$, respectivamente) para el caso del Tritón. Sin embargo, la interacción de ambos factores fue estadísticamente significativo ($P<0.001$); consecuentemente, se han categorizado 3 grupos diferentes (a, b y c, Fig. 4 del anexo 4). Hay que tener en cuenta que la extracción con citrato + Tween 20, citrato + Tritón X-102 y tartrato + Tritón X-102 mostraron valores medios iguales estadísticamente ($P=0.07$).

Para la extracción de β -caroteno, las sales seleccionadas, los surfactantes y sus interacciones fueron altamente significativos de acuerdo con los resultados ANOVA ($P<0.001$). Se clasifican en cuatro grupos diferentes (1, 2, 3 y 4) en orden ascendente. El valor más elevado de β -caroteno se obtuvo cuando se usó carbonato

como agente inductor de la formación de fases en Tritón X-102 (85.06 ± 2.4 . a $P < 0.05$).

En general, según las recientes conclusiones de Freire *et al.* (2011), la eficacia de la extracción del antioxidante va a depender principalmente de la hidrofobicidad del soluto bioactivo y de las interacciones con la sal y el surfactante. Por lo tanto, los rendimientos de extracción de los antioxidantes hidrofóbicos podrían ser controlados mediante la selección adecuada de un agente de extracción (sales orgánicas o inorgánicas). Los sistemas que muestran el rendimiento de extracción más alto para los tres compuestos antioxidantes están formados por Tritón X-102 + tartrato de sodio y Tween 20 + citrato de sodio. Debido al hecho de que este último implica más ventajas operacionales, tales como una formación más rápida de la fase, éste será el sistema seleccionado para seguir con la aplicación de este método con muestras reales obtenidas del cultivo de la microalga *T. suecica*.

B) SISTEMA REAL CON LA MICROALGA T. SUECICA

La parte final del trabajo consistió en una combinación de las dos etapas estudiadas previamente en una muestra real de la microalga *T. suecica*: ruptura celular de las células de microalga con surfactante y la extracción de antioxidantes por medio del ATPS con surfactante. Teniendo en cuenta los resultados previos referidos al efecto lítico de los surfactantes, se seleccionó una disolución acuosa de Tritón X-114 con el objetivo de lograr una recuperación de las biomoléculas antioxidantes intracelulares deseadas. Adicionalmente, el segundo paso consistió en el ATPS formado por Tween 20 y citrato de sodio, como sustituto de los disolventes orgánicos volátiles empleados en los métodos de extracción convencionales.

Un factor importante a tener en cuenta es la evaluación de la bioactividad de los extractos obtenidos con la estrategia propuesta. Por lo tanto, en primer lugar se determinó la bioactividad por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como un ensayo estándar para evaluar el potencial antioxidante. Así, la fase superior rica en Tween 20 posee tres veces más actividad antioxidante que la registrada en la fase inferior, rica en citrato de sodio (174 vs 437 $\mu\text{mol/L}$ de MDA). Este hecho indica que el sistema propuesto sería viable y sería el punto de partida para el uso de esos extractos con propósitos antioxidantes.

La presencia de diferentes componentes como los flavonoides, enzimas o vitaminas puede jugar un papel decisivo en la actividad antioxidante de los extractos de microalgas. Más específicamente, y como ya se ha detallado previamente, se ha enfocado la actividad antioxidante de *T. suecica* en las tres biomoléculas objetivo especificadas anteriormente: α -tocoferol, β -caroteno y ácido gálico (Ulloa *et al.* 2011b). Un ejemplo de ello es el análisis del contenido de esos antioxidantes en las muestras de la extracción con ATPS-surfactante. Los rendimientos obtenidos de antioxidantes se representan en la Tabla 2 del anexo 4 y se comparan con los obtenidos cuando se aplica el método tradicional de ultrasonidos. Los resultados revelaron que el contenido total de cada compuesto bioactivo es mucho mayor cuando se usa un surfactante como un agente lítico en lugar del método de ultrasonido.

En resumen, la estrategia propuesta de combinar el uso del surfactante para la lisis celular y como agente de extracción, puede ser implementada satisfactoriamente para la producción de compuestos bioactivos a partir de microalgas.

3.5 ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE LOS EXTRACTOS DE *T. SUECICA*

En este trabajo se estudio el efecto de los extractos de la microalga *T. suecica* en la citotoxicidad y la actividad anticancerígena en líneas celulares de próstata (PC3). Para ello se prepararon los extractos a partir de la aplicación de diferentes procedimientos: ultrasonido, baño de ultrasonido y el uso de disolventes, con extracciones en *batch* o secuenciales, tal como se describe en la metodología.

3.5.1 VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular, medida tal como se describió (sección 2.5 de materiales y métodos), fue superior al 89% con todos los extractos ensayados. Por tanto el efecto antiangiogénico (inhibición de la vascularización celular) observado con el ELISA no puede ser atribuido a un aumento de la mortalidad celular, sino más bien a la composición de los extractos ensayados. En este sentido, la citotoxicidad mostrada por los extractos de *T. suecica* (nunca superior al 11%) fue inferior que la mostrada por los extractos de *Spirulina maxina* con un 19.1% (Oh *et al.* 2011).

3.5.2 ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA

La evaluación del nivel de proteína VEGF extracelular fue determinada en los sobrenadantes de células PC3 incubadas durante 48 horas con diferentes extractos naturales empleándose una técnica de ELISA. Los resultados obtenidos, que se muestran en la Fig. 3.12 donde se presenta el % relativo al control de la expresión de la VEGF para cada uno de los extractos a las 3 concentraciones ensayadas (50,100 y

200 mg/L), indican que el extracto TSUS1 indujo una importante sobreexpresión de VEGF en todo el rango de concentraciones utilizadas. Un efecto similar fue observado en el tratamiento de las células con TSUS2 a la máxima concentración ensayada (200 mg/L).

Los extractos TSUS2 (50mg/L ó 100 mg/L), TSUS4, TSES1, TSES2 (200mg/L) y TSES3 (100 y 200 mg/L) indujeron un ligero cambio en la concentración de VEGF medida en el sobrenadante ($p>0.05$). Sin embargo, se asoció un importante efecto antiangiogénico ($p<0.05$) a los extractos: TSUS3 (todas las concentraciones), TSES2 (50 mg/L y 100mg/L) y TSES3 (50mg/L) con un valor alrededor del 40-50% superior al encontrado en el control (Fig. 3.13).

Con los resultados obtenidos se demuestra que el método de extracción es un factor clave en la obtención de moléculas con más o menos bioactividad; así se tiene que los compuestos presentes en la muestra mediante extracción acuosa no tienen efecto antiangiogénico alguno. Pero, por otra parte, el extracto metanólico preparado en baño de ultrasonido produce un gran efecto en la actividad antiangiogénica. Otro de los factores claves es la dosis utilizada, donde con TSUS1, TSUS3, TSUS4 y TSES1, la actividad mejora conforme aumenta la dosis del extracto añadido en el cultivo celular. En el resto de los tratamientos este comportamiento es inverso.

Muchos de los productos naturales potentes que muestran actividades eficaces contra el cáncer han sido descubiertos en el mundo marino. De hecho, desde principios de los 90's, ha incrementado drásticamente el número de compuestos contra el cáncer a partir de fuentes marinas que se han utilizado en ensayos clínicos humanos (Newman y Cragg 2004; Mayer y Gustafson 2008). Polisacáridos sulfatados, oligosacáridos no digeribles y derivados de la clorofila han sido extensamente estudiados por su actividad anticancerígena, antimutagénica y por inducir apoptosis en las células cancerígenas (Lordan *et al.* 2011).

Aparte de esta actividad en células prostáticas, se ha documentado que las moléculas con actividad antioxidante como los polifenoles también presentan actividad como inhibidores de las células de carcinoma de mama (Rice-Evans *et al.* 1996). Además, se cree que el α -tocoferol juega un papel importante en la

prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Carballo-Cárdenas *et al.* 2003).

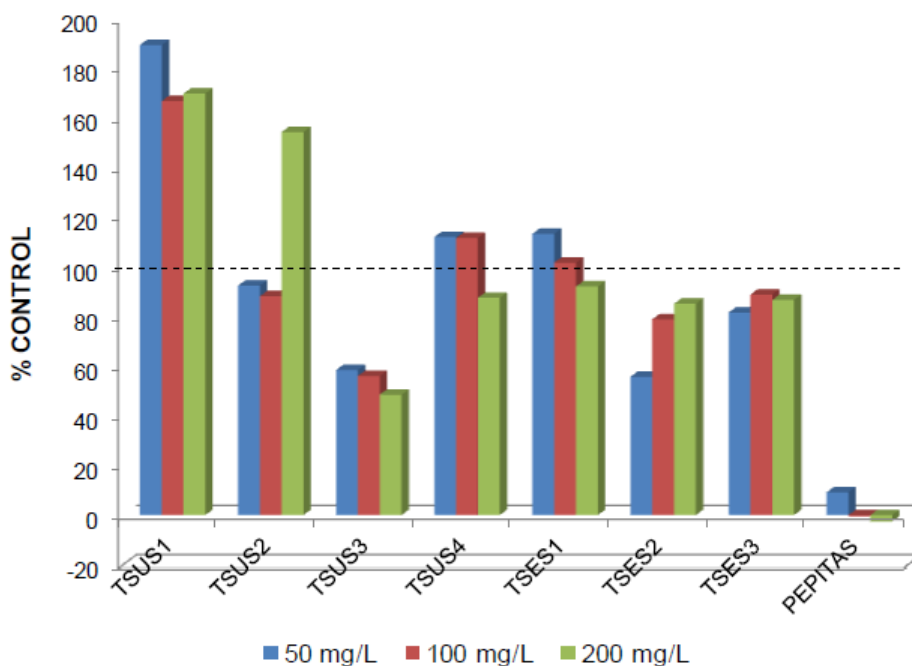


Figura 3.12 Actividad antiangiogénica de los extractos de *T. suecica* en líneas celulares de cáncer de próstata.

Del mismo modo, las ficocianinas, vitamina B₁₂, ácidos fenólicos y tocoferoles aislados a partir de *Spirulina platensis* parecen presentar actividad antitumoral y anticancerígena (Oh *et al.* 2011). Asimismo se ha demostrado que extractos ricos en flavonoides de *Chlorella vulgaris* reducen la migración de células tumorales, lo que conlleva una inhibición de la metástasis (Wang *et al.* 2010). También se determinó que los extractos acuosos de esta misma microalga disminuyen la tasa de proliferación de células cancerígenas de hígado e indujeron apoptosis a una dosis de 2000 µg/ml (Saad *et al.* 2006). Por otra parte, se encontró que extractos de *Spirulina máxima*, obtenidos por un proceso de extracción con ultrasonido inhibieron selectivamente la proliferación de células cancerígenas de estómago hasta un 89%; también este mismo extracto inhibió la fase temprana de la carcinogénesis (Lee *et al.* 2007).

En nuestro caso, los extractos más activos obtenidos con *T. suecica* fueron los preparados con metanol en baño de ultrasonido, mientras que los procedentes de la extracción acuosa en ultrasonido fueron los que menor actividad anticancerígena presentaron.

Lo anterior demuestra que los diferentes procesos de extracción utilizados determinan la naturaleza de las moléculas con actividad antioxidante, estando presentes en *T. suecica* los polifenoles, β -caroteno, α -tocoferol, además de otros pigmentos, ácidos grasos (saturados e insaturados: ω -3 y ω -6), carbohidratos y proteínas; la actividad anticancerígena podría deberse a estas moléculas individualmente o a una combinación de ellas. En este sentido, Lee *et al.* (2007) sugieren que la actividad anticancerígena de *S. máxima* se debe principalmente a los polisacáridos solubles en agua que contienen los extractos en lugar de las proteínas. Otros de los compuestos a los que se les presupone actividad antitumoral fueron determinados por Hasegawa *et al.* (2002) y Noda *et al.* (1996), que encontraron una glicoproteína rica en galactosa en el sobrenadante de *C. vulgaris*.

Dada la importancia de estos resultados preliminares, la caracterización completa del extracto metanólico de *T. suecica* que presentó el mayor efecto antiangiogénico en las células cancerígenas de próstata será uno de los objetivos a tener en cuenta en futuras investigaciones de nuestro grupo.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

En esta Tesis se evaluó el efecto de la adición de magnesio, silicio y estroncio al medio de cultivo de *Tetraselmis suecica* para mejorar la densidad celular y la productividad, teniendo en cuenta también los cambios experimentados en la actividad antioxidante y en los compuestos posiblemente responsables de dicha actividad como consecuencia del escalado del cultivo. Además se aplicaron los sistemas bifásicos acuosos (ATPS) para la extracción de los compuestos antioxidantes manteniendo su bioactividad. Finalmente, los extractos de la biomasa de *T. suecica* se aplicaron a cultivos de células cancerígenas de próstata con la finalidad de evaluar su actividad antiangiogénica. De los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que:

- 1) La adición de magnesio y silicio al medio de cultivo de *T. suecica* a una concentración de 3 mM y el estroncio a 0.1 mM, conllevaron una alta densidad celular en el estado estacionario y alta productividad en un cultivo semicontinuo con tasa de renovación del 40%.
- 2) Los extractos de la biomasa de *T. suecica* exhibieron alta actividad antirradical y de protección de la peroxidación de lípidos con los diferentes disolventes utilizados para la extracción.
- 3) El escalado del cultivo favoreció la producción de compuestos con actividad antioxidante en la biomasa de *T. suecica*.
- 4) El estroncio a concentración 10 mM provocó un mayor crecimiento celular y la acumulación de fucoxantina y β -caroteno en cultivos en semicontinuo de *T. suecica*.

- 5) Los compuestos fenólicos identificados en la biomasa de *T. suecica* fueron: etil éster de la β -Alanina-N-(2metilbenzoil), N-(2-fenil etil)(3(E),6(Z),8(E)-decatrienamida, ácido 2, 5-hexadecanoico, 2 metil, 3 benzofuranil. Además se identificaron derivados del caroteno (Astaxantina), y los fitoesteros: campesterol y 24-metilen-colesterol.
- 6) Es viable la utilización del Tritón X-114 en la lisis celular de *T. suecica* para obtener una eficiente extracción de compuestos antioxidantes intracelulares mediante la aplicación de sistemas bifásicos acuosos (ATPS), principalmente el formado por Tween 20 y citrato de sodio, manteniendo su bioactividad.
- 7) Los extractos metanólicos de *T. suecica* preparados en baño de ultrasonido, exhibieron hasta un 50% más actividad antiangiogénica que el control, en células cancerígenas de próstata (PC3).

CAPÍTULO 5

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd El-Baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS (2009) Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects *in vitro* toward hepatotoxicity model. *Afr J Pharm Pharmacol* 3:133-139

Albertsson PA (1986) *Aqueous Polymer-phase Systems*, John Wiley and Sons, New York.

Aruoma OI, Murcia A, Butler J, Halliwell B (1993) Evaluation of the antioxidant and prooxidant action of gallic acid and its derivatives. *J Agric Food Chem* 41:1880-1885

Aruoma OI (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* 75:199-212

Avery SV, Smith SL, Mohamad-Ghazi A and Hoptroff MJ. (1999) Stimulation of strontium accumulation in linoleate-enriched *Saccharomyces cerevisiae* is a result of reduced Sr^{2+} Efflux. *Appl Environ Microb* 65:1191–1197.

Azma M, Rahim RA, Mohames R, Ariff AB (2009) Heterotrophic cultivation of microalga *Tetraselmis suecica* in stirred tank bioreactor for biomass and bio-fuel production. *International Advanced of Technology Congress*. Malaysia.

Azma M, Mohamad R, Abdul-Rahim R, Ariff AB (2010) Improved protocol for the preparation of *Tetraselmis suecica* axenic culture and adaptation to heterotrophic cultivation. *The Open Biotechnology Journal* 4:36-46

Azma M, Mohamed MS, Mohamad R, Abdul-Rahim R, Ariff AB (2011) Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 53:187–195.

Barbosa, M.J. (2003) Hydrodynamic stress and lethal events in sparged microalgae cultures. *Biotechnol Bioengineer* 83:112-120.

Bauer CS, Plieth C, Bethmann B, Popescu O, Hansen U, Simonis W, Schönknecht G (1998) Strontium-induced repetitive calcium spikes in a unicellular green alga. *Plant Physiol.* 117:545–557.

- Becker EW** (1994). Microalgae: Biotechnology and microbiology. Cambridge University Press. London. pp. 301
- Benzie IFF, Strain JJ** (1996) The ferric reducing ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76
- Bernot RJ, Kennedy EE, Lamberti GA**, (2005) Effects of ionic liquids on the survival, movement, and feeding behavior of the freshwater snail. *Physa acuta*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24:1759-1765.
- Bittencourt SE, Sturm W, Carvalho JC, Thomaz-Soccol V, Larroche C, Pandey A, Soccol CR** (2010) Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresour Technol* 101:5892–5896
- Bligh EG, Dyer J** (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem Physiol* 37:911-917
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C** (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Can J Biochem Physiol* 28(1):25-30
- Brennan L, Owende P** (2010) Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2):557-577.
- Brown SD, Martin M, Deshpande S, Seal S, Huang K, Alm E, Yang Y, Wu L, Yan T, Liu X, Arkin A, Chourey K, Zhou J, Thompson D** (2006) Cellular response of *Shewanella oneidensis* to strontium stress. *Appl Environ Microbiol* 72(1):890-900
- Buege JA, Aust SD** (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302–310
- Butcher RW** (1959) An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. I. Introduction and Chlorophyceae. *Fish Invest. London* 4:71-74.
- Carballo-Cárdenas EC, Tuan PM, Janssen M, Wijffels RH** (2003) Vitamin E (α -tocopherol) production by marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering* 20 139-147.
- Carvalho AP, Pontes I, Gaspar H, Malcata FX** (2006) Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. *Enzyme and Microbial Technology* 38:358-366
- Cha KH, Kang SW, Kim CY, Um BH, Na YR, Pan CH** (2010) Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *J Agric Food Chem* 58:4756–4761
- Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JH** (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour Technol* 102(1):71-81

- Chikhaoui MA, Sakka-Hlaili A, Mabrouk HH** (2008) Réponses saisonnières du phytoplancton aux rapports d'enrichissements N:Si:P dans la lagune de Bizerte (Sud-Ouest de la Méditerranée) C. R. Biologies 331: 389–408.
- Chini-Zittelli G, Rodolfi L, Biondi N, Tredicci NR** (2006) Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. Aquaculture 261:932-943
- Chinnici F, Bendini A, Gaiani A, Riponi C** (2004) Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden delicious apples as related to their phenolic composition. J. Agric. Food Chem. 52:4684-4689.
- Chipault JR** (1962) Autoxidation and autoxidants. Wiley, New York.
- Chisti F** (2007) Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 25:294–306.
- Cid A, Abalde J, Herrero C** (1992) High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher (Prasinophyceae). Journal of Applied Phycology 4: 31-37.
- Clayton GD, Clayton FE** (1993) Patty's industrial hygiene and toxicology, vol II, Part A. Toxicology, 4th ed, , John Wiley & Sons Inc, New York. p. 776-778.
- Contreras-Flores C, Peña-Castro JM, Flores-Cotera LB, and Cañizares-Villanueva RO** (2003) Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Interciencia 28:450–456.
- Cohen Z** (1999). Chemicals from microalgae. Edit. Taylor y Francis Ltd. p. 425.
- Coombs J, Darley WM, Holm-Hansen O, Volcani BE** (1967) Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in Diatoms. Chemical composition of *Navicula pelliculosa* during silicon-starvation synchronyl. Plant Physiology. 42:1601-1606.
- Coradin T, Desclés J, Luo G, López PJ** (2006) Silicon in the photosynthetic lineages: Molecular mechanisms for uptake and deposition. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Vol. IV. Global Science Books, UK. p. 238-244.
- Cuaresma M, Janssen M, Vilchez C, Wijffels RH** (2011) Horizontal or vertical photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency. Bioresource Technology 102:5129–5137.
- Culkin F, Cox RA** (1966) Sodium, potassium, magnesium, calcium, and strontium in seawater. Deep-Sea Res 13:789-804.
- Deive FJ, Rivas MA, Rodríguez A** (2011a) Sodium carbonate as phase promoter in aqueous solutions of imidazolium and pyridinium ionic liquids. J. Chem. Thermodyn. 43:1153–1158.

Deive FJ, Rodríguez A, Pereiro AB, Araújo JMM, Longo MA, Coelho MAZ, Canongia Lopes JN, Esperança JMSS, Rebelo LPN, Marrucho IM, (2011) *Ionic liquid-based aqueous biphasic system for lipase extraction*. Green Chem. 13:390–396.

Deng G, Lin DQ, Yao SJ, Mei LH (2007) Aqueous micellar two-phase system composed of hyamine-type hydrophobically modified ethylene oxide and application for cytochrome P450 BM-3 separation. Journal of Chromatography B, 852:167–173.

D'Souza FML, Kelly GJ (2000) Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. Aquaculture 181: 311–329.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 28(3):350-356.

Exley C, Tollerver A, Gray G, Roberts S, Birchall D (1993) Silicon, aluminium and the biological availability of phosphorus in algae. Biological Sciences 253:93-99.

Fábregas J, Herrero C, Cabezas B, Abalde J (1985) Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentration. Aquaculture 49:231-244.

Fábregas J, Ferrón L, Gamallo Y, Vecino E, Otero A and Herrero C. (1994) Improvement of growth rate and cell productivity by aeration rate in cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. Bioresour Technol 48:107-111.

Fábregas J, Patiño M, Vecino E, Cházaro F, Otero A (1995) Productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. J Appl Microbiol Biotechnol 43:617-621.

Fábregas J, Patiño M, Morales E, Cordero B, Otero A (1996) Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in semicontinuous cultures. Appl Environ Microbiol 62:266-268.

Fábregas J, Aran J, Morales ED, Lamella T, Otero A (1997) Modification of sterol concentration in marine microalgae. Phytochemistry 46:1189–1191.

Fábregas J, Domínguez A, Regueiro M, Maseda A, Otero A (2000) Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. Appl Microbiol Biotechnol 53:530-535.

Fábregas J, Otero A, Domínguez A, Patiño M (2001) Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia species*. J Mar Biotechnol 3:256–263.

Faison BD, Cancel CA, Lewis SN, Adler HI (1990) Binding of Dissolved Strontium by *Micrococcus luteus*. Applied and Environmental Microbiology 56(12):3649-3656.

- Falinsky KA** (2009) Effects of different aeration conditions on *Isochrysis galbana* (T-iso) CCMP 1324 in a bench-scale photobioreactor. Master Thesis. Faculty of the Graduate School of Cornell University, USA.
- Fernández SJM, Cerón GMC, Sánchez MA, Belarbi EH, García CF, Molina GE** (2004) Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricornutum* using glycerol in vertical bubble column and airlift photobioreactors: studies in Fed-batch mode. *Biotechnol Prog* 20:728-736.
- Ferreira LA, Teixeira JA, Mikheeva LM, Chait A, Zaslavsky BY** (2011) Effect of salt additives on partition of nonionic solutes in aqueous PEG–sodium sulfate two-phase system. *Journal of Chromatography A* 1218(31): 5031-5039.
- Ferreira JF, Curvelo-Santana JC, Tambourgi EB** (2007) The Effect of pH on Bromelain Partition from *Ananas comosus* by PEG4000/Phosphate ATPS. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54:125-132.
- Freire MG, Neves CMSS, Marrucho IM, Canongia Lopes JN, Rebelo LPN, Coutinho JAP** (2011) High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids. *Green Chem.* 12:1715–1718.
- Fuhrman JA, Chisholm SW, Guillard RRL** (1978) Marine alga *Platymonas* sp. accumulates silicon without apparent requirement. *Nature* 272:244-246.
- Gotham IJ, Rhee G J** (1982) Effects of nitrate and phosphate limitation on cyclostat growth of two freshwater diatoms. *Journal of General Microbiology* 128:199-205.
- Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX** (2011) Microalgae as sources of high added-value compounds-A brief review of recent work. *Biotechnol. Prog.* 27(3):597-611.
- Hajimahmoodi M, Faramarzi MA, Mohammadi N, Soltani N, Reza OM, Nafissi-Varcheh N** (2010) Valuation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J Appl Phycol* 22:43–50.
- Han J, Yu C, Wang Y, Xie X, Yan Y, Yin G, Guan W** (2010) Liquid–liquid equilibria of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and sodium citrate/tartrate/acetate aqueous two-phase systems at 298.15 K: Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilibria* 295:98-103.
- Harun R, Singh M, Forde GM, Danquah MK** (2010) Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:1037–1047.
- Hasegawa T, Matsuguchi T, Noda K, Tanaka K, Kumamoto S, Shoyama Y, Yoshikai Y** (2002) Toll- like receptor 2 is at least partly involved in the antitumor activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *International Immunopharmacology* 2: 579-589.
- Herbert D, Phipps PJ, Strano RE** (1971) Chemical analysis of microbial cells. In: Norris JR and Robbins DW (eds) *Methods in microbiology*. Academic Press, China, p. 209-234.

- Hosikian A, Lim S, Halim R, Danquah MK** (2010) Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering*. DOI:10.1155/2010/391632.
- Huang WY, Cai YZ, Zhang YB** (2010) Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer* 62:85 1-20.
- Jeffrey SW, Humphrey GF** (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanz* 167:191-194.
- Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Pulido R, Saura-Calixto F** (2001) Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J Sci Food Agric* 81:530-534.
- Kochert G** (1978) Physiological and biochemical methods. In: Hallebust A, Craigie JS (ed) *Handbook of phycological methods*, vol. 2. Cambridge Univ. Press, London, p. 95- 97.
- Kunzelmann K** (2005) Ion channels and cancer. *J. Membrane Biol* 205:159-173.
- Lebeau T, Robert JM** (2003) Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part. I: Cultivation at various scales. *Appl Microbiol Biotechnology* 60 :612-623.
- Lee SH, Chang DU, Lee BJ, Jeon YJ** (2009) Antioxidant activity of solubilized *Tetraselmis suecica* and *Chlorella ellipsoidea* by enzymatic digests. *J Food Sci Nutr* 14:21-28.
- Li M, Xu J, Liu Z, Xu J** (2004) Strontium stress on marine microalgae *Dicrateria inornata* growth and antioxidant enzymes activities. *Oceanologia Et Limnologia Sinica* 5:1121-1125.
- Li M, Xie X, Xue R, Liu Z** (2006) Effects of strontium-induced stress on marine microalgae *Platymonas subcordiformis* (Chlorophyta: Volvocales). *Chinese J Oceanol Limnol* 24(2):154-162.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y** (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *J Food Chem* 102:771–776.
- Liang L, Zheng J, Zhao X** (2009) Distribution of Antioxidases in Cell of Diatom *Nitzschia closterium* and Response to Different Environmental Silicon Concentrations. *ESIAT* 1:545-548.
- Lin DS, Ilias Am, Connor WE, Caldwell RS, Cory HT, Doyle-Daves G** (1982) Composition and biosynthesis of sterols in selected marine phytoplankton. *Lipids* 17(11):818-824.
- Lordan S, Paul-Ross R, Stanton C** (2011) Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Mar. Drugs* 9, 1056-1100; DOI:10.3390/md9061056.

- Lu F, Foo LY** (1995) Phenolic antioxidant components of *Evening primrose*. In: A. S. H. Ong, E. Niki, L. (ed) Packer, nutrition, lipids, health, and disease. Champaign: American Oil Chemists' Society, USA, p 86-95.
- MacIntyre HL, Sharkey TD, Geider RJ** (1997) Activation and deactivation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) in three marine microalgae. *Photosynthesis Research* 51: 93–106.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L** (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79(5):727-47.
- Marcus Y** (1991) Thermodynamics of solvation of ions Part 5.-Gibbs free energy of hydration at 298.15 K. *J. Chem. Soc. Faraday Trans* 87:2995–2999.
- Marini A, Imelio N, Picó G, Romanini D, Farruggia B** (2011) Isolation of a *Aspergillus niger* lipase from a solid culture medium with aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879(22):2135-2141.
- Marsh JB, Weinstein DB** (1966) Simple charring method for determination of lipids. *J Lipid Res* 7:574-576.
- Martins JP, Coimbra JSR, Oliveira FC, Sanaiotti G, Silva CAS, Silva LHM, Silva MCH**, (2010) Liquid–Liquid Equilibria of an Aqueous Two-Phase System Containing Poly(ethylene) Glycol 1500 and Sulfate Salts at Different Temperatures. *J. Chem. Eng. Data* 55:1247-1251.
- Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masak K, Masuda Y** (1997) A comparison of screening methods for antioxidants activity in seaweeds. *J. Applied Phycol* 9:29-35.
- Mayer AMS, Gustafson KR** (2008) Marine pharmacology in 2005–2006: Antitumour and cytotoxic compounds. *Eur. J. Cancer* 44:2357–2387.
- McLachlan J** (1973) Growth media-marine. In: Stein JR (ed) Handbook of phycological methods and growth measurements. Cambridge University Press, London, p. 25 – 52.
- Mendiola JA, Marín FR, Hernández SF, Arredondo BO, Señoráns FJ, Ibáñez E, Reglero G** (2005) Characterization via liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry of supercritical fluid antioxidant extracts of *Spirulina platensis* microalga. *J. Sep. Sci.* 28:1031–1038.
- Mendoza H, De la Jara A, Carmona D, Freijanes PK** (2010) Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. *Aquaculture Int* 18:189-199
- Merchuk JC, Andrews BA, Asenjo JA** (1998) Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation: Studies on Phase Inversion, *J. of Chromatography B* 711:285-293.
- Milledge JJ** (2011) Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 10:31–41.

Miller HE (1971) Simplified method for the evaluation of antioxidants. J Am Oil Chem Soc 48:91-93.

Minguez-Mosquera MI, Hornero-Sánchez D (1993) Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. J Agric Food Chem 41:1616-1620.

Miyake Y, Yamamoto K, Morimitsu Y, Osawa T (1997) Isolation of C-glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. J Agric Food Chem 45:4619-4623.

Mokhtarani B, Sharifi A, Mortaheb HR, Mirzaei M, Mafi M, Sadeghian F (2009) Density and viscosity of pyridinium-based ionic liquids and their binary mixtures with water at several temperatures. J.Chem.Thermodynamics 41(3):323-329.

Morelli E, Scarano G (2004) Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Plant Sci 167:289-296.

Morineau TO, Legentilhomme P, Jaouen P, Lepine B, Rince Y (2001) Influence a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*. Biotechnology Letters, 23: 1539-1545.

Natrah FMI, Yusoff FM, Shariff M, Abas F, Mariana NS (2007) Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. J Appl Phycol 19:711-718.

Nichols HW (1973) Growth media-freshwater. In: Stein J R (ed) Handbook of phycological methods and growth measurements. Cambridge University Press, London, pp 25-52.

Noda K, Ohno N, Tanaka K, Okuda M, Yadomae T, Nomoto K, Shoyama YA (1996) Water soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. Planta Med 62:419-423.

Newman D, Cragg G (2004) Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. Curr. Med. Chem. 11:1693-1713.

Oh SH, Ahn J, Kang DH, Lee HY (2011) The Effect of Ultrasonicated Extracts of *Spirulina maxima* on the Anticancer Activity. Mar Biotechnol 13:205-214.

Otero A (1995) Modificación de la composición bioquímica de microalgas marinas en régimen de ciclostato. Tesis doctoral, Universidad de Santiago. Santiago, España.

Otero A, Fábregas J (1997) Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. Aquaculture 159:111-123.

- Othmer DF, Tobias PE** (1942) Tie-line correlation Ind. Eng. Chem. 34:693–696.
- Pasternak K, Kocot J, Horecka A** (2010) Biochemistry of magnesium. J. Elemental 15:601-616.
- Patterson GW, Tsitsa-Tzardis E, Wikfors GH, Gladu PK, Chitwoodh DJ, Harrison D** (1993) Sterols of *Tetraselmis* (Prasinophyceae). Comp. Biochem. Physiol 105(2): 253-256.
- Pei Z, Lin D, Song X, Li H, Yao H** (2008) TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGFbeta1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide. Cellular Immunology 254(1):20-27.
- Pei Y, Wang J, Wua K, Xuana X, Lu X** (2009) Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. *Sep Purif Technol* 64:288-295.
- Plaza M, Herrero M, Cifuentes A, Ibañez E** (2009) Innovative natural functional ingredients from microalgae. J Agric Food Chem 57:7159-7170.
- Pomomarenko LP, Stonik IV, Aizdaicher NA, Yu OT, Popovskaya GI, Pomazkina G V, Stonik VA** (2004). Sterols of marine microalgae *Pyramimonas* cf. *cordata* (Prasinophyta), *Attheya ussurensis* sp. nov. (Bacillariophyta) and a spring diatom. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 138(1):65-70.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C** (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26:1231-1237.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga P** (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology & Medicine 20(7): 933-956.
- Richmond A** (2004) Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Publishing, p-566.
- Rodolfi L, Chini ZG, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici M** (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. Biotechnol Bioeng 102(1):100-112.
- Rodríguez- García I, Guil-Guerrero JL** (2008) Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. Food Chem 108:1023–1026.
- Rodríguez-Meizoso I, Jaime L, Santoyo S, Señoráns FJ, Cifuentes A, Ibañez E** (2010) Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. J Pharm Biomed Anal 51:456–463.
- Roessler PG** (1988) Effects of silicon deficiency on lipid composition and metabolism in the diatom *Cyclotella cryptica*. J Phycol 24(3):394 – 400.

- Rubilar M, Pinelo M, Shene C, Sineiro J, Nuñez MJ** (2007) Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: Almond Hulls and Grape Pomace. *J. Agric. Food Chem.* 55:10101–10109.
- Saad SM, Mohd-Yusof YA, Wan-Engah WZ** (2006) Comparison between locally produced *Chlorella vulgaris* and *Chlorella vulgaris* from Japan on proliferation and apoptosis of liver cancer cell line, HepG2. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 13:32-36.
- Salabat A, Moghadam ST, Far MR** (2010) Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Composed of TritonX-100 and Sodium Citrate or Magnesium Sulfate Salts Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry 34:81–83.
- Sánchez JF, Fernández-Sevilla JM, Acién FG, Cerón MC, Pérez-Parra J, Molina-Grima E** (2008) Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. *J Appl Microbiol Biotechnol* 79:719–729.
- Sánchez-Machado DI, López-Hernández J, Paseiro-Losada P, López-Cervantes J** (2002) High-performance liquid chromatographic determination of α -tocopherol in macroalgae. *J Chromatogr A* 976:277–284.
- Sánchez-Machado DI, López-Hernández J, Paseiro-Losada P, López-Cervantes J** (2004) An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomed. Chromatogr* 18:183–190.
- Sánchez-Mirón A, Cerón-García MC, Contreras-Gómez A, García-Camacho F, Molina-Grima E, and Chisti Y.** (2003) Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem Engineer J* 16:287–297.
- Sato N, Murata N** (1988) Membrane lipids. *Methods of enzymology* 167:251-259.
- Satyanarayana KG, Mariano AB, Vargas JVC** (2011) A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *Int. J. Energy Res.* 35:291–311.
- Seixas P, Rey-Méndez M, Valente LMP, Otero A** (2008) Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture* 283:83–91.
- Shahidi F, Zhong Y** (2005) Lipid oxidation: Measurement methods, in Bailey's industrial oil and fat products. Shahidi F (ed). Wiley, New York, pp. 366-367.
- Shaul O** (2002) Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *BioMetals* 15:309-323.
- Siddiqui EJ, Shabbir M** (2006) The Role of Serotonin (5-Hydroxytryptamine1A and 1B) Receptors in Prostate Cancer Cell Proliferation. 176:1648-1653.

- Sigaud-Kutner TCS, Neto AMP, Pinto E, Colepicolo P** (2005) Diel activities of antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and malondialdehyde content in stationary-phase cells of *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae). *Aquatic Botany* 82:239–249.
- Singleton VL, Rossi JA** (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144–158.
- Spreitzer RJ, Salvacci ME** (2002). RUBISCO: structure, regulatory interaction and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:449–75.
- Subagio A, Morita N, Sawada** (1996) Carotenoids and their fatty acids esters in banana peel. *J Nutr Sci Vitaminol* 42:553–566.
- Summerhayes CP, Thorpe SA** (1996) *Oceanography an illustrated guide*. Prentice Hall, New York.
- Tafreshi AH, Shariati M** (2006) Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for β -carotene production in open ponds in the central region of Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:1003–1006.
- Thomas WH, Seibert DLR, Alden M, Neori A, Eldridge P** (1984) Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures: II. *Dunaliella primolecta* and *Tetraselmis suecica* experiments. *Biomass* 5:211–225.
- Thomsen J, Johnson KS, Petty RL** (1983) Determination of reactive silicate in seawater by flow injection analysis. *Anal. Chem.* 55:2378–2382.
- Tréguer P, Nelson DM, Van-Bennekom AJ, DeMaster DJ, Leynaert A, Quéguiner B** (1995) The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science* 268, 375–379.
- Tsukamoto M, Taira S, Yamamura S, Morita Y, Nagatani N, Takamura Y, Tamiya E** (2009) Cell separation by an aqueous two-phase system in a microfluidic device. *Analyst* 134:1994–1998.
- Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H** (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae". *Bioresource Technology* 99(10): 4021–4028.
- Ulloa G, Coutens C, Sánchez M, Sineiro J, Rodríguez A, Deive FJ, Núñez MJ** (2011a) Sodium salt effect on aqueous solutions containing Tween 20 and Triton X-102. *J. Chem. Thermodynamics*. DOI:10.1016/j.jct.2011.09.021.
- Ulloa G, Otero A, Sánchez M, Sineiro J, Núñez MJ, and Fábregas J.** (2011b) Effect of Mg, Si and Sr on growth and antioxidant activity of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *J Appl Phycol* DOI: 10.1007/s10811-011-9764-2.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J** (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 39:44–84.

- Vega-Estrada J, Montes-Horcasitas MC, Domínguez-Bocanegra AR, and Cañizares-Villanueva RO** (2005) *Haematococcus pluvialis* cultivation in split-cylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**:31–35.
- Volkman JK, Barret SM, Dunstan GA, Jeffrey SW** (1994) Sterol biomarkers for microalgae from the green algal class Prasinophyceae. *Organic Geochemistry*. **21**(12):1211-1218.
- Waites MJ, Morgan NL, Rockey JS, Highton G** (2001) *Industrial Microbiology: An introduction*. Blackwell Science Ltd., p. 288.
- Wang HM, Pan JL, Chen CY, Chiu CC, Yang MH, Chang HW, Chang JS** (2010) Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Process Biochem* **45**:1865–1872.
- Weissman J, Goebel RP, Benemann JR** (1988) Photobioreactor design: comparison of open ponds, *Bioeng Biotech* **31**:336-344.
- Wong Ch, Li H, Cheng KW, Chen F** (2006) A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem* **97**:705–711.
- Wu B, Zhang Y, Wang H** (2008) Phase Behavior for Ternary Systems Composed of Ionic Liquid + Saccharides + Water *J. Phys. Chem. B* **112**:6426–6429.
- Xie X, Han J, Wang Y, Yan Y, Yin G, Guan W** (2010) Measurement and Correlation of the Phase Diagram Data for PPG₄₀₀ + (K₃PO₄, K₂CO₃, and K₂HPO₄) + H₂O Aqueous Two-Phase Systems at T = 298.15 K. *Journal of Chemical & Engineering Data* **55**(11):4741-4745.
- Zaborsky RO, Mitsui A, Clanton C, Black Jr** (1983) *Handbook of biosolar resources*. CRC Prees, Inc, Florida, USA. p. 657.
- Zhang Y, Cremer PS** (2006) Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**:658–663.
- Zhu CJ, Lee YK** (1997) Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *J Appl Phycol* **9**:189–194.
- Zijffers JWF, Schippers KJ, Zheng K, Janssen M, Tramper J, Wijffels RH** (2010) Maximum Photosynthetic Yield of Green Microalgae in Photobioreactors. *Mar Biotechnol* **12**:708–718.

ANEXO

ARTÍCULOS

PUBLICACIÓN 1

Effect of Mg, Si and Sr on growth and antioxidant activity of the marine microalga

Tetraselmis suecica

Journal of Applied Phycology (2011) DOI: 10.1007/s10811-011-9764-2

REVISTA: Journal of Applied Phycology

ÍNDICE DE IMPACTO EN 2010: 1.792

ISSN: 0921-8971 (print version)

ISSN: 1573-5176 (electronic version)

EDITORIAL: Springer

PAÍS: Netherlands

PUBLICACIÓN 2

Effect of culture scale-up and strontium addition on antioxidant activity of

Tetraselmis suecica grown in a semicontinuous culture

Submitted to *Bioprocess and Biosystems Engineering*

REVISTA: Bioprocess and Biosystems Engineering

ÍNDICE DE IMPACTO EN 2010: 2.06

ISSN: 1615-7591 (print version)

ISSN: 1615-7605 (electronic version)

EDITORIAL: Springer

PAÍS: Alemania

PUBLICACIÓN 3

Sodium salt effect on aqueous solutions containing Tween 20 and Triton X-102

Journal of Chemical Thermodynamics (2011) DOI:10.1016/j.jct.2011.09.021

REVISTA: Journal of Chemical Thermodynamics

ÍNDICE DE IMPACTO EN 2010: 2.794

ISSN: 0021-9614

EDITORIAL: Elsevier

PAÍS: Alemania

PUBLICACIÓN 4

On the double role of surfactants as microalga cell lysis agents and antioxidants
extractants.

Green Chemistry (enviado)

REVISTA: Green Chemistry

ÍNDICE DE IMPACTO EN 2009: 5.84

ISSN: 1385-8947

EDITORIAL: RSC Publishing

PAÍS: U.K

ARTÍCULOS ANEXOS

- ANEXO 1: EFFECT OF MG, SI, AND SR ON GROWTH AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE MARINE MICROALGA *TETRASELMIS SUECICA* (JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY (2011) DOI 10.1007/s10811-011-9764-2)
- ANEXO 2: EFFECT OF CULTURE SCALE-UP AND STRONTIUM ADDITION ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *TETRASELMIS SUECICA* GROWN IN A SEMICONTINUOUS CULTURE (SENT TO BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING)
- ANEXO 3: SODIUM SALT EFFECT ON AQUEOUS SOLUTIONS CONTAINING TWEEN 20 AND TRITON X-102 (JOURNAL OF CHEMICAL THERMODYNAMICS (2011) DOI:10.1016/J.JCT.2011.09.021)
- ANEXO 4: ON THE DOUBLE ROLE OF SURFACTANTS AS MICROALGA CELL LYSIS AGENTS AND ANTIOXIDANTS EXTRACTANTS (SENT TO GREEN CHEMISTRY JOURNAL)

ANEXO 1

Effect of Mg, Si, and Sr on growth and antioxidant activity of the marine microalga *Tetraselmis suecica*

Gabriela Ulloa · Ana Otero · Marivel Sánchez · Jorge Sineiro · María José Núñez · Jaime Fábregas

Received: 7 July 2011 / Revised and accepted: 16 November 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract Efforts to increase the productivity of microalgal cultures have been focused on the improvement of photo-bioreactors, but little attention has been paid to the nutritional requirements of microalgae in order to improve culture media formulation. In this study, the main goal was obtaining a high productivity for *Tetraselmis suecica* (Chlorophyta) in semicontinuous culture by adding magnesium (Mg), silicon (Si), and strontium (Sr) at concentrations from 0.01 to 10 mM; at the time, the effect on steady-state cell density, biochemical composition, and antioxidant activity of *T. suecica* was evaluated. Because productivity is higher in high-density cultures, the work was focused many times to cell density. Mg (3 mM) and Sr (0.1 mM) added separately reached the highest steady-state cell density ($7.0 \times 10^6 \pm 0.4$ cells mL⁻¹) in comparison to control (4.2 ± 0.1 cells mL⁻¹), but simultaneous addition had a synergic effect, achieving $8.7 \times 10^6 \pm 0.6$ cells mL⁻¹. Silicon (3 mM) significantly affected the steady-state cell density, reaching

6.0 ± 0.3 cells mL⁻¹ and increased the cell ash-free dry weight, reaching 127 ± 7.9 pg cell⁻¹ in comparison to control (102.7 ± 5.0 pg cell⁻¹), resulting in an ash-free dry weight productivity of 0.75 ± 0.07 gL⁻¹ day⁻¹. The highest fatty acids content and antioxidant activity, measured by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method were obtained with Sr 10 mM. Sr treatments showed a high correlation ($R^2=0.98$) between DPPH inhibition and polyphenolic content, explaining its high antioxidant activity. Therefore, it is recommended the addition of Mg, Si, and Sr to culture medium of *T. suecica* to achieve high steady-state cell density in semicontinuous cultures.

Keywords Antioxidant activity · Magnesium · Biomass productivity · Silicon · Strontium · *Tetraselmis suecica*

Introduction

Microalgae are microorganisms of high biotechnological potential due to their ability to produce molecules with interesting applications in the areas of food, pharmacology, and health (Plaza et al. 2009). Besides the environmental applications, the interest in microalgae production has increased in the last decade because of its potential for bio-diesel production (Chen et al. 2011; Chisti 2007). Most efforts to improve microalgae productivity have been focused on the improvement of culture systems and operation. Photo-bioreactor design has allowed increasing productivities in almost one order of magnitude compared with the traditional culture systems (Azma et al. 2009; Chini-Zittelli et al. 2006). Culture operation has also been demonstrated to be a key factor to improve productivity and for the fine tuning of biochemical composition of microalgae biomass (Fábregas

G. Ulloa · M. Sánchez · J. Sineiro · M. J. Núñez
Department of Chemical Engineering, Technical School of Engineering, University of Santiago de Compostela,
Av. Lope Gómez de Marzoa s/n,
15782 Santiago de Compostela, Spain

A. Otero · J. Fábregas
Department of Microbiology, Pharmacy School,
University of Santiago de Compostela,
Av. Praza Seminario de Estudos Galegos s/n,
15782 Santiago de Compostela, Spain

G. Ulloa (✉)
Department of Biotechnology and Food Science,
Sonora Institute of Technology,
Antonio Caso s/n,
85135 Ciudad Obregón, México
e-mail: rulloa@itson.mx

et al. 2001; Otero and Fábregas 1997). Nevertheless, while these advances have allowed a great amelioration in light and mass transfer efficiencies, little attention has been paid to the study of the nutritional requirements of microalgae in order to formulate new optimized culture media that allow taking full advantage of the improvements in the engineering of culture systems. In this way, the culture media commonly used are formulations developed in the 1960s and 1970s (Harrison and Berges 2005) or are based in fertilizers, in which the nutritional requirements of microalgae are assumed to be equal to those of terrestrial plants (McLachlan 1973). The importance of culture medium optimization has been already demonstrated for the freshwater microalga *Haematococcus pluvialis* (Fábregas et al. 2000). The establishment of new optimized formulations is especially relevant for marine microalgae, since many trace elements are not included in the formulation of culture media for marine species on the basis of their presence in marine salts, but their requirements should be revised for the ultra-high densities that can be achieved in the new culture systems. In this work, the effect of Mg, Si, and Sr on the growth and composition of *Tetraselmis suecica* was tested. Mg has been included as macronutrient in all formulations for freshwater microalgae (reviewed by Nichols 1973), but has not been considered for marine microalgae (McLachlan 1973) due to the high Mg content of seawater. Silicon is considered as a macronutrient for diatoms, silicoflagellates, and some chrysophytes but not for the rest of microalgae (Harrison and Berges 2005); however, the ability to accumulate Si has been demonstrated in *Platymonas (Tetraselmis)* sp., which has been described as a non-Si-requiring microalga (Fuhrman et al. 1978). Strontium is one of the most abundant elements on earth and is common in seawater (Ferrier-Pagès et al. 2002), but it is not considered as an essential nutrient in marine microalgae. However, it has been demonstrated that *Platymonas (Tetraselmis)* species have high uptake capacity for strontium, and it has been used for induction of high antioxidant activity in these species (Li et al. 2006). Moreover, preliminary analysis of the mineral composition of *T. suecica* biomass carried out in our laboratory with a culture medium devoid of Mg and Sr demonstrated similar amounts of both elements (unpublished results), although Mg concentration in seawater is 160 times greater than Sr concentration (Summerhayes and Thorpe 1996), which may indicate a special requirement for Sr in this species. *T. suecica* was selected for this study because it is extensively used in aquaculture; it is easy to cultivate with high productivities, and it has been considered as a good candidate for biodiesel production (Rodolfi et al. 2009). Therefore, the aim of this work was to analyze the effect of Mg, Si, and Sr on growth, biochemical composition, and induction of bioactive antioxidant compounds in *T. suecica*.

Materials and methods

Sterilized seawater (salinity 3.5‰) was enriched with nutrients NaNO_3 , 4 mmol L^{-1} ; NaH_2PO_4 , 0.2 mmol L^{-1} ; ZnCl_2 , 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; MnCl_2 , 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Na_2MoO_4 , 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; CoCl_3 , 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; CuSO_4 , 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; ferric citrate, 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$; thiamine, 70 $\mu\text{g L}^{-1}$; biotin, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$; vitamin B_{12} , 6 $\mu\text{g L}^{-1}$; EDTA, 52.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (control medium, Fábregas et al. 1985). Autoclaved solutions of magnesium ($\text{MgCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), silicon ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), and strontium ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) were added separately to this culture medium in final concentrations of 0.01, 0.1, 1, 3, and 10 mM. The effect of simultaneous addition of Mg and Sr in concentrations 3 and 0.1 mM, respectively, was also analyzed. Cultures were carried out in triplicate using tubular glass bioreactors (diameter, 33 mm). The marine microalga *T. suecica* (Kyllin) Butcher 03/0205 (strain isolated from Ría de Arousa, Spain) and deposited in the collection of Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Spain; the microalga was inoculated in the bioreactor at a cell density of 2.7×10^6 cells mL^{-1} and allowed to reach the stationary phase. Once cultures achieved the early stationary phase (6 days after the inoculation), semi-continuous mode was started by a daily renewal of 40% of the bulk volume. Cultures were maintained under circadian light regime with periods of 12:12 light/dark (Otero and Fábregas 1997) and a light intensity of 220 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 20°C, with an airflow 100 mL min^{-1} supplemented with CO_2 , by applying a pulse of 10 s every 10 min during light period to maintain pH between 7 and 8. Renewal was carried out during the first hour of the light period, by withdrawing the established volume of the culture and replacing it with fresh medium enriched with the same concentration of initial nutrients. The steady-state was achieved 8 days after the semi-continuous regime was started, as assessed by cell density. Cultures were kept in a semi-continuous regime for 65 days. Samples were collected by centrifugation; frozen biomass of *T. suecica* for biochemical analysis and freeze-dried biomass for trace element analysis and antioxidant assay were used.

Analytical methods

Growth was measured daily by microscope cell counting using an improved Neubauer hemacytometer. Cell ash-free dry weight (AFDW) determination was made according to the method proposed by Zhu and Lee (1997). Carbohydrates were measured by the phenol-sulphuric acid method (Kochert 1978) and lipid by the charring method (Marsh and Weinstein 1966) after extraction (Bligh and Dyer 1959); proteins were estimated by the modified Lowry method (Herbert et al. 1971). For trace element analysis, 0.5 g of freeze-dried samples were digested with 8 mL HNO_3 and 2 mL H_2O_2 at 200°C for 10 min and was

analyzed by inductively coupled plasma using a Varian 820-MS with auto-sampler SPS3. For fatty acid analysis, lipid extracts (Bligh and Dyer 1959) were subjected to methanolysis with 5% HCl in methanol at 85°C for 2.5 h (Sato and Murata 1988), extracted with hexane, and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (Fisons Instruments MD-800) using an Omega-wax 250 (Supelco) column. Fifty microliters of heptadecanoic acid was added to samples as internal standard. The fatty acids identification was made by comparison of the mass spectra within the databases NIST and WILEY.

For antioxidant activity measurements, 1 g of freeze-dried biomass was extracted with 33 mL of methanol/water (1:1). This mixture was stirred in a vortex for 30 s and placed in an ultrasound bath (Elmasonic S40H, Germany) on ice for 45 min; the extract was centrifuged (Sigma Laborzentrifugen, Germany) at $360 \times g$ for 10 min, and the supernatant was collected and filtered through a 0.45- μm Millex GN filter (Millipore, USA). The antioxidant activity was determined in the extracts by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method (Brand-Williams et al. 1995), and the total polyphenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi 1965).

Statistical analysis

Experimental data for each response variable was analyzed by ANOVA using the GLM procedure (SPSS version 15 for Windows 2006). When main factors were significant, an adequate post hoc test (Tukey, test) was performed. When the second-order interactions were significant, simple comparisons of a factor between levels of another factor were performed using the Bonferroni test. The correlation between polyphenol content and DPPH radical scavenging activity was determined by Pearson's linear correlation procedure using the SPSS software package.

Results

The growth of microalgae is strongly affected by culture conditions, culture system, and medium composition; in this work, the effect of magnesium (Mg), silicon (Si), and strontium (Sr) added at concentrations from 0.01 to 10 mM, on steady-state cell density, biochemical composition, and antioxidant activity of semicontinuous cultures of *T. suecica* was evaluated. Taking into account that the high productivity is always related to the high cell density, this relation was evaluated.

Cell density

Stationary-phase cell density and specific growth rate of *T. suecica* did not show differences between treatments (data

not shown), although the growth rate obtained with 0.01 mM Mg was slightly higher (0.36 day^{-1}) than that of the other treatments, including control (0.32 day^{-1}). Whereas the addition of Mg, Si, and Sr did not affect growth rate of *T. suecica* in batch cultures, important differences in Sr cultures were observed for the steady-state cell density of semi-continuous cultures (Fig. 1). Mg did not entail any inducing effect at concentrations lower than 1 mM, showing cell densities similar to control (from 4.2 to $4.4 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$), but a positive effect was observed with the two highest concentrations tested, achieving a statistically significant increase (Tukey, $p < 0.05$) of 68% and 40%, respectively, in comparison to control. Silicon treatments showed the same behavior as Mg concentrations, although the addition of Si was beneficial only for 3 mM concentration ($6 \pm 0.3 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$). As for strontium, highest steady-state densities were achieved with concentrations of 0.1 to 1 mM, achieving 7.0 ± 0.9 and $6.9 \pm 0.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$, respectively (Fig. 1). Higher Sr concentrations were detrimental. A culture with simultaneous addition of Mg (3 mM) and Sr (0.1 mM) was carried out to check a possible positive effect at the concentrations that produced the maximal steady-state cell densities when Mg and Sr were added separately, and further increment in the steady-state cell density was recorded ($8.7 \pm 0.61 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$, data not shown).

Cell AFDW and productivity

The effect of Mg addition on AFDW and productivity was not significant (Fig. 2), but it was beneficial for steady-state cell density at 3 mM concentration (Fig. 1), achieving the highest cell density of all treatments ($7.0 \pm 0.8 \text{ cells mL}^{-1}$). The AFDW was mainly influenced by Si and Sr addition. On the one hand, Si increased the AFDW at 3 and 10 mM concentrations, with significantly (Tukey, $p < 0.05$) high productivities (Fig. 2). On the other hand, Sr addition adversely

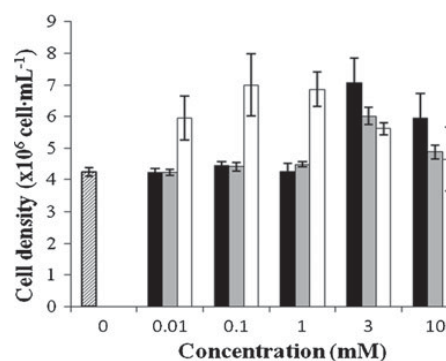


Fig. 1 Steady-state cell density of *T. suecica* in semi-continuous cultures with different concentrations of Mg (black square), Si (gray square), Sr (white square), and control (diagonally lined square)

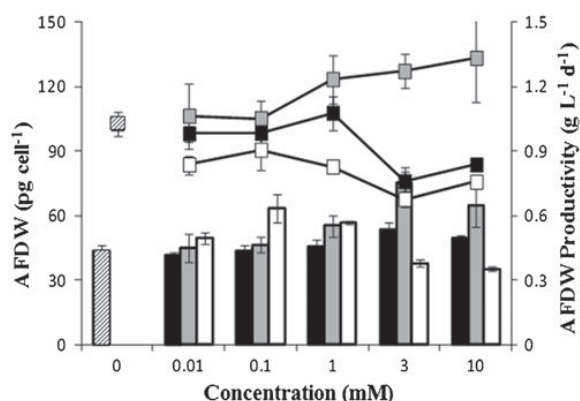


Fig. 2 (Bars) Ash-free dry weight productivities; (lines) cellular ash-free dry weight of *T. suecica* in semi-continuous cultures with different concentrations of Mg (black square), Si (gray square), Sr (white square), and control (diagonally lined square)

affected cell AFDW at all concentrations tested. Nevertheless, due to the high steady-state cell density promoted in these treatments (Fig. 1), it was possible to achieve a high productivity at 0.1 mM concentration (Fig. 2). An inverse correlation between AFDW and concentration of Mg and Sr and a direct correlation to Si treatments were observed. Higher correlations also were observed between cell density and productivity in Mg, Si, and Sr treatments.

The content of 26 trace elements was analyzed in the biomass produced in control, Si, and Sr at 10 mM concentration, although only the major trace elements, representing the 99% of the total content, are shown in Fig. 3. The biomass analysis revealed that Si promotes the incorporation of other cations as Na, Ca, and Mg. On the contrary, Sr treatment incorporated mainly Sr (66.8 ± 5.7 mg g⁻¹ dry weight) that was ninefold higher than the control (7.3 ± 0.8 mg g⁻¹ dry weight).

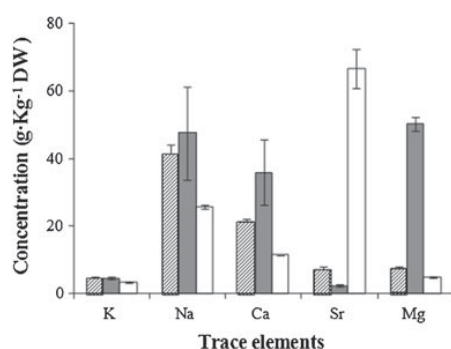


Fig. 3 Major trace elements content of *T. suecica* biomass cultured in control (diagonally lined square), Si 10 mM (gray square), and Sr 10 mM (white square) conditions

Biochemical composition

The biochemical composition of *T. suecica* cells varies depending on culture conditions, cultivation techniques, and medium composition. In this work, Mg, Si, and Sr were added in order to modify the composition of the culture medium but maintaining N-NO₃ concentration at 4 mM and a renewal rate of 40%. Protein content was slightly affected by the addition of the trace elements to the medium (Fig. 4a). Only Mg at 0.01 and 1 mM and Si at 0.01 mM concentration provided higher levels of proteins than the control. The percentage of lipids was significantly enhanced by Sr at 3 and 10 mM, whereas Si addition resulted in a lower content of lipids (Fig. 4b). The carbohydrate percentage was strongly affected by the addition of Sr at 1 mM, whereas lower and higher concentrations led to lower content of carbohydrates (Fig. 4c). Si concentration showed a negative correlation with the percentage of protein, lipids, and carbohydrates, with the values obtained being lower than those of control.

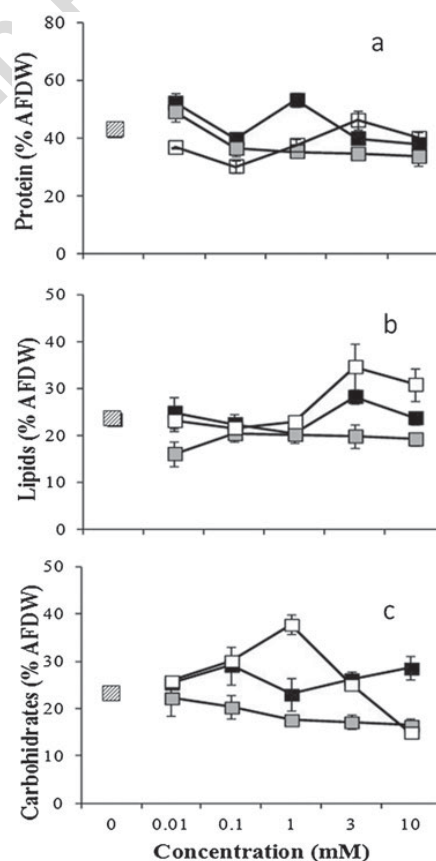


Fig. 4 Cellular AFDW percentage of: a Protein; b lipid; c carbohydrates in *T. suecica* cultured semi-continuously with different concentrations of Mg (black square), Si (gray square), and Sr (white square), and the control (diagonally lined square)

Fatty acids were not affected by the addition of trace element to the cultures of *T. suecica* (Table 1). Mg and Si (3 and 10 mM for both) and Sr at all concentrations tested led to fatty acids levels between 42% and 52% of total lipids, achieving the maximum content of fatty acids in Sr 10 mM (10.2 ± 0.3 pg cell⁻¹), a value significantly higher than that of control (Tukey, $p < 0.05$). The fatty acids present in the cells showed the following order in abundance—16:0 > 18:1 > 18:3 ω -3 > 16:4 ω -3 > 18:2 ω -6 > 20:5 ω -3 > 18:4 ω -3 (Table 1). Although the saturated and mono-unsaturated fatty acids were most abundant in the control, no significant effect of trace element addition on fatty acids composition can be concluded (Table 1). ω -3 Fatty acids showed a direct relationship with the concentration of trace elements, except for 20:5 ω -3 in Sr treatment, where an inverse effect was observed.

significantly higher than the control value (Tukey, $p < 0.05$). Furthermore, linear correlation between total polyphenols and DPPH inhibition percentage was found as can be seen in Fig. 5b, which suggests that the polyphenolic compounds in methanol extract are likely responsible for the antioxidant activity. Cultures with Si at 0.01 mM showed maximum DPPH inhibition percentage of 40.2 ± 2 and 1.2 ± 0.07 mgGAE g⁻¹. Furthermore, the linear correlation coefficient between total polyphenols and DPPH inhibition percentage was reasonably high ($r^2 = 0.67$). The maximum DPPH inhibition for culture with 1 mM of Mg was 41.2 ± 2.2 mgGAE g⁻¹, and the polyphenols concentration was 1.1 ± 0.08 mg GAE g⁻¹. The correlation between polyphenols and antioxidant activity was very low indicating the absence of a relationship between them in Mg cultures.

Antioxidant activities and polyphenol content

Antioxidant activity and total polyphenol concentration were measured in the methanol extracts obtained from *T. suecica* biomass. DPPH radical scavenging method was used, and antioxidant activity was expressed as inhibition percentage of DPPH. Total polyphenols are expressed as mg of gallic acid equivalent per g of dry biomass (mgGAE g⁻¹). The maximum polyphenols concentration (3.5 ± 0.24 mgGAE g⁻¹) was found in the treatment with 10 mM Sr, presenting also the maximum DPPH inhibition percentage ($77.0 \pm 1.7\%$, Fig. 5a), which is

Discussion

One of the purposes of this study was to achieve a high steady-state cell density in cultures of *T. suecica* operating in semi-continuous mode by adding Mg, Si, and Sr to culture medium. In this way and according to the abovementioned results, the addition of Sr and Mg (0.1 and 3 mM, respectively) in the formulation of the culture medium for *T. suecica* as a means to increase steady-state cell density is recommended. Similar results were obtained with Si at 3 mM concentration.

The Mg concentration in artificial seawater and freshwater formulations is usually low, in the range of 0.04 to 1 mM

Table 1 Fatty acid composition as percent of total fatty acid (>5% of total fatty acids) in *T. suecica* growth with different Mg, Si, and Sr concentrations (the data correspond to three replicates \pm standard deviation)

| Percent of total fatty acid | 16:0 | 16:4 ω -3 | 18:1 | 18:2 ω -6 | 18:3 ω -3 | 18:4 ω -3 | 20:5 ω -3 | Total fatty acid (pg/cell) |
|-----------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------|
| 0 (control) | 32.4 \pm 0.5 | 8.8 \pm 0.2 | 22.5 \pm 0.6 | 4.3 \pm 0.0 | 11.2 \pm 0.3 | 3.2 \pm 0.0 | 3.9 \pm 0.1 | 4.1 \pm 0.3 |
| Mg (mM) | | | | | | | | |
| 0.01 | 23.5 \pm 1.7 | 11.0 \pm 1.0 | 20.0 \pm 0.5 | 5.7 \pm 0.8 | 14.9 \pm 1.2 | 4.5 \pm 0.8 | 4.3 \pm 0.1 | 7.9 \pm 1.2 |
| 0.1 | 29.8 \pm 1.2 | 11.8 \pm 1.7 | 19.5 \pm 1.3 | 6.0 \pm 0.8 | 13.0 \pm 0.4 | 4.1 \pm 0.7 | 3.8 \pm 0.2 | 5.6 \pm 0.6 |
| 1 | 29.8 \pm 1.7 | 9.6 \pm 0.9 | 21.6 \pm 0.3 | 5.3 \pm 0.0 | 13.7 \pm 0.3 | 3.6 \pm 0.4 | 4.0 \pm 0.1 | 4.0 \pm 0.9 |
| 3 | 29.5 \pm 1.4 | 14.4 \pm 0.4 | 14.1 \pm 0.5 | 3.6 \pm 0.1 | 16.8 \pm 0.2 | 6.0 \pm 0.2 | 5.3 \pm 0.2 | 9.2 \pm 0.7 |
| 10 | 30.9 \pm 1.0 | 16.2 \pm 1.5 | 14.1 \pm 1.1 | 3.5 \pm 0.0 | 16.2 \pm 0.4 | 5.8 \pm 0.1 | 5.4 \pm 0.7 | 9.9 \pm 0.9 |
| Si (mM) | | | | | | | | |
| 0.01 | 29.4 \pm 2.5 | 10.5 \pm 0.9 | 19.8 \pm 0.7 | 4.6 \pm 0.3 | 13.7 \pm 1.2 | 4.1 \pm 0.5 | 4.5 \pm 0.5 | 5.1 \pm 0.3 |
| 0.1 | 29.1 \pm 1.4 | 10.3 \pm 0.4 | 21.0 \pm 1.1 | 4.7 \pm 0.1 | 13.6 \pm 0.2 | 4.2 \pm 0.2 | 4.7 \pm 0.4 | 4.0 \pm 0.4 |
| 1 | 30.0 \pm 1.8 | 10.6 \pm 0.3 | 20.4 \pm 0.7 | 4.5 \pm 0.5 | 13.4 \pm 0.9 | 4.0 \pm 0.3 | 5.1 \pm 0.4 | 7.3 \pm 0.9 |
| 3 | 31.4 \pm 1.2 | 13.0 \pm 1.0 | 15.6 \pm 1.1 | 3.6 \pm 0.1 | 15.9 \pm 0.7 | 5.7 \pm 0.5 | 6.2 \pm 0.4 | 9.3 \pm 0.8 |
| 10 | 30.3 \pm 1.6 | 13.2 \pm 1.6 | 16.1 \pm 1.1 | 5.2 \pm 0.3 | 11.6 \pm 0.1 | 7.6 \pm 0.6 | 6.5 \pm 0.8 | 9.2 \pm 0.2 |
| Sr (mM) | | | | | | | | |
| 0.01 | 25.8 \pm 0.2 | 12.8 \pm 0.1 | 15.6 \pm 0.2 | 5.6 \pm 0.2 | 17.1 \pm 0.3 | 5.0 \pm 0.1 | 6.8 \pm 0.2 | 9.0 \pm 0.8 |
| 0.1 | 25.5 \pm 0.7 | 12.9 \pm 0.9 | 15.9 \pm 1.0 | 5.8 \pm 0.2 | 17.4 \pm 0.4 | 5.2 \pm 0.4 | 6.6 \pm 0.1 | 8.5 \pm 0.3 |
| 1 | 27.0 \pm 1.5 | 13.9 \pm 0.3 | 14.8 \pm 0.3 | 4.8 \pm 0.3 | 17.8 \pm 0.4 | 5.7 \pm 0.3 | 6.3 \pm 0.5 | 8.7 \pm 0.9 |
| 3 | 26.6 \pm 0.8 | 14.2 \pm 0.4 | 14.5 \pm 0.6 | 4.3 \pm 0.2 | 17.9 \pm 0.2 | 6.1 \pm 0.5 | 6.3 \pm 0.1 | 8.7 \pm 0.7 |
| 10 | 28.4 \pm 0.8 | 15.1 \pm 1.6 | 16.4 \pm 0.3 | 3.5 \pm 0.1 | 16.5 \pm 1.1 | 6.2 \pm 0.9 | 6.3 \pm 0.7 | 10.2 \pm 0.3 |

Total fatty acid content (as pg cell⁻¹) is also shown

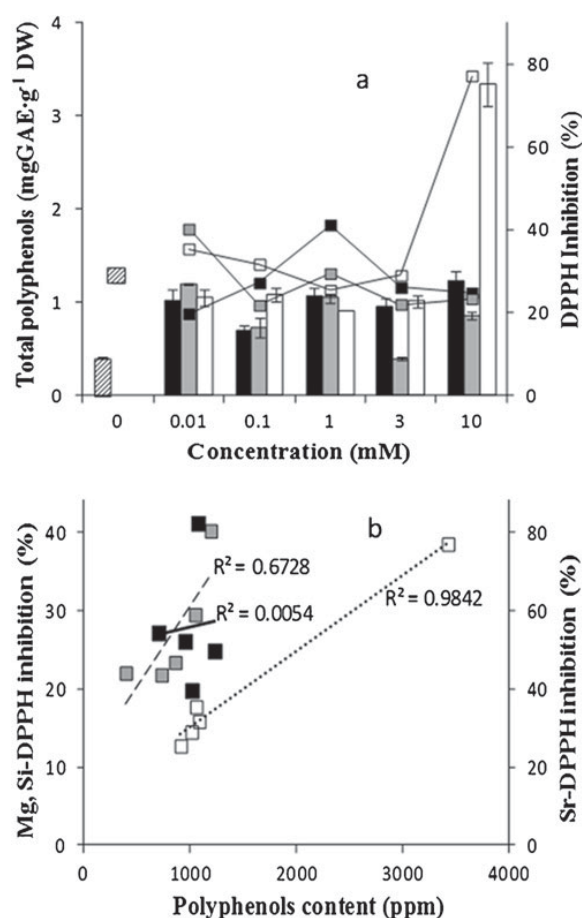


Fig. 5 Antioxidant activity for methanol–water (50%) extracts of *T. suecica* cultured with Mg (black square), Si (gray square), Sr (white square), and control (diagonally lined square); **a** Antiradical activity as percent inhibition of DPPH (lines) and total polyphenols content as gallic acid equivalents (bars); **b** correlation between antiradical activity and polyphenol content

within the cell and in nucleic acids synthesis) is affected by factors such as pH and the presence of Mg and various metals (Becker 1994). In addition, Mg also can regulate the transport through the Ca-channels of the cell membrane by improving their permeability (Pasternak et al 2010).

In spite of the fact that Sr is not considered as an essential nutrient in marine microalgae, its addition to the culture medium was performed based on preliminary data obtained from cultures of *T. suecica* carried out without Mg and Sr (unpublished results). From these results, similar amounts of both elements were found, although Mg concentration in seawater is 160 times greater than the Sr concentration (Summerhayes and Thorpe 1996), thus suggesting a special behavior in this species. This observation was confirmed by the analysis of trace elements (Fig. 3), which shows a greater accumulation of Sr in the microalga biomass. In this work, Sr concentrations of 0.01 and 1 mM induced an elevated steady-state cell density, which decreased when Sr content was higher than 1 mM, maybe due to metal stress. However, steady-state cell density for all the Sr concentrations tested was higher than that reported by Otero and Fábregas (1997) under similar conditions to those of the control culture.

The ability of Sr to replace Ca in animal bones has been reported recently (Li et al 2004), and this phenomenon may also be possible in microalgae, thus leading to differences in cell wall composition or to an increase in cell size (Becker 1994). In this sense, the microalga *Eresmophaera viridis* cultured at high Sr concentrations showed a high depolarization of the membrane and a Sr-competitive interaction with plasma membrane Ca²⁺ channels (Bauer et al 1998). At first glance, ion channels may affect proliferation in two ways: On the one hand, any cell requires ion channel function to maintain homeostatic parameters such as the intracellular ion concentration, cytosolic pH, and cell volume, and to allow uptake of substrates and release of metabolic products; on the other hand, ion channel activity is required at special check points during the cell cycle and therefore will have a precise role in cell proliferation (Kunzelmann 2005). In this way, the microalga *Dicrateria inornata* was cultured in a medium enriched with strontium and similar growth, and higher chlorophyll *a* levels were reported. However, at higher concentrations (23 mM), a decrease in cell density and chlorophyll *a* content was evident (Li et al 2004). Later, Li et al. (2006) showed a slightly decreased cell density in cultures of *Platymonas (Tetraselmis) subcordiformis* when 5 or 11 mM of Sr was used, while concentrations less than 1.4 mM did not cause growth inhibition, in agreement with what was observed in this work. It is worth mentioning that cultures with 10 mM Sr led to the formation of precipitate and a film on the wall of the reactor, likely due to excess Sr or to cellular metabolic activities leading to metal precipitation, either directly through microbiological catalyzed redox reactions, or indirectly through the

production and secretion of reactive inorganic ligands, such as carbonates, as discussed by Brown et al. (2006).

The beneficial effect of Si on growth of diatoms has been demonstrated, but little information exists about the Si effect on other non-Si-requiring microalgae. From the results obtained for *T. suecica* that are shown in Fig. 1, a beneficial effect the steady-state cell density can be concluded at higher Si concentration (3 mM specifically). Si addition also had a beneficial effect on cell ash free dry weight of *T. suecica*, with a positive correlation between AFDW and Si concentrations, and also between AFDW productivity and Si concentration. Although the reason for this increase in cell density is not easy to explain; in this sense, Exley et al. (1993) observed that Si stimulated growth in the presence of aluminum in *Chlorella vulgaris* (a non-silicon-dependent green alga), in which the increase in growth rate upon the addition of silicon could be directly correlated with an increase in the biologically available phosphorus fraction. They contend that a possible hitherto unrecognized mechanism of silicon essentiality in biology is to increase the biological availability of phosphorus in the presence of aluminum. On the other hand, it has been reported that *Platymonas (Tetraselmis)* sp. (a non Si-requiring genus) was not affected by Si addition and grows equally in Si-rich or Si-poor environments (Fuhrman et al. 1978).

Also, it is known that Na_2SiO_3 is slightly soluble in water at pH around neutrality and is only hydrolyzed to free sodium ions and silicic acid (the bioavailable form) when the solution is heated or acidified (Clayton and Clayton 1993). However, Si may induce a high incorporation of cations such as Mg^{2+} and Ca^{2+} (Fig. 3), thus promoting cell growth as mentioned above. In summary, detailed research on the effect of Si on growth and productivity of *T. suecica* should be further considered.

Finally, the addition of these trace elements furthered increased ash-free dry weight productivities, even higher than biomass productivity reported by authors as Rodolfi et al. (2009) in batch cultures (from 0.28 to 0.32 $\text{g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) or Seixas et al. (2008) and Chini-Zittelli et al. (2006) in semi-continuous cultures (0.13 and 0.5 $\text{g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ g in 1-L flasks and 120-Lannular columns, respectively). In the present study, biomass productivity with 3 mM Si was up to three times higher than those previously cited.

Generally speaking, the analysis of the biochemical composition showed that Mg and Sr addition (at some concentrations) led to a slight improvement of AFDW percentage of protein (Fig. 4a), lipids (Fig. 4b), and carbohydrates (Fig. 4c). On the one hand, some nutrient limitation (specifically nitrogen) due to the high cell density and metal stress should not be discounted. Roessler (1988) showed lipid accumulation in microalgae when cells are environmentally stressed, as could be the case in cultures with Sr at 3 and 10 mM. On the other hand, the results obtained

suggest that *T. suecica* accumulates carbohydrates as energy reserve, because 1 mM Sr resulted in a high steady-state cell density and therefore low nitrogen available per cell; Thomas et al. (1984) also observed that carbohydrates were accumulated as energy storage under nitrogen starvation. In agreement with this, Otero and Fábregas (1997) observed the same effect in *T. suecica* cultured semi-continuously with low renewal rate.

The levels of fatty acids content achieved for the best treatments also were similar to those reported by others (Mendoza et al. 2010; Otero and Fábregas 1997). The most abundant saturated and monounsaturated fatty acids were 16:0 and 18:1, in accordance with previous results (Mendoza et al. 2010; Otero and Fábregas 1997).

Microalgae are microorganisms that carry out oxygenic photosynthesis and produce reactive oxygen and free radicals in this process. For their defence, the microalgae produce antioxidant compounds to avoid oxidative damages (Lu and Foo 1995). In some microalgae, the antioxidant activity is attributed to unsaturated fatty acid content (Li et al. 2006), or to a synergism between several compounds in the microalgae (Rodríguez-García and Guil-Guerrero 2008) such as simple phenols, vitamin E, and carotenoids (Rodríguez-Meizoso et al. 2010). In *T. suecica* cultured with Sr, the antioxidant activity was probably due to the presence of polyphenols because a high correlation between polyphenols and DPPH inhibition percentage was demonstrated (see also, Hajimahmoodi et al. 2010).

The high percentage of DPPH inhibition of extracts obtained in this work (81%) was better than the value obtained (71%) when enzymatic digestion was used for extract preparation of *T. suecica* cultured without Sr addition (Lee et al. 2009). The enzymatic digestion was then applied to eliminate materials of the microalgae wall, which may interfere with the proper extraction of bioactive compounds. In *P. (T.) subcordiformis*, Sr induced oxidative stress, and the antioxidant activity increased by 55% in comparison to control, using superoxide dismutase activity and malondialdehyde content (Li et al. 2006). Induction mechanisms involved in the activation of polyphenol production triggered by the addition of Sr 10 mM to the microalga culture is an area to be investigated in the future.

References

- Azma M, Rahim RA, Mohames R, Ariff AB (2009) Heterotrophic cultivation of microalga *Tetraselmis suecica* in stirred tank bioreactor for biomass and bio-fuel production. International Advances of Technology Congress, Malaysia
- Bauer CS, Plieth C, Bethmann B, Popescu O, Hansen U, Simonis W, Schönknecht G (1998) Strontium-induced repetitive calcium spikes in a unicellular green alga. Plant Physiol 117:545–557

- Becker EW (1994) Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge University, London, p 301
- Bittencourt SE, Sturm W, Carvalho JC, Thomaz-Soccol V, Larroche C, Pandey A, Soccol CR (2010) Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresour Technol* 101:5892–5896
- Bligh EG, Dyer J (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem Physiol* 37:911–917
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Can J Biochem Physiol* 28(1):25–30
- Brown SD, Martin M, Deshpande S, Seal S, Huang K, Alm E, Yang Y, Wu L, Yan T, Liu X, Arkin A, Chourey K, Zhou J, Thompson D (2006) Cellular response of *Shewanella oneidensis* to strontium stress. *Appl Environ Microbiol* 72:890–900
- Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JH (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresour Technol* 102:71–81
- Chini-Zittelli G, Rodolfi L, Biondi N, Tredici NR (2006) Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261:932–943
- Chisti F (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294–306
- Clayton GD, Clayton FE (1993) Patty's industrial hygiene and toxicology, part A, vol II, 4th edn. John Wiley & Sons Inc, New York, pp 776–778
- Culkin F, Cox RA (1966) Sodium, potassium, magnesium, calcium, and strontium in seawater. *Deep-Sea Res* 13:789–804
- Exley C, Tolliver A, Gray G, Roberts S, Birchall D (1993) Silicon, aluminium and the biological availability of phosphorus in algae. *Biol Sci* 253:93–99
- Fábregas J, Herrero C, Cabezas B, Abalde J (1985) Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentration. *Aquaculture* 49:231–244
- Fábregas J, Domínguez A, Regueiro M, Maseda A, Otero A (2000) Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:530–535
- Fábregas J, Otero A, Domínguez A, Patiño M (2001) Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *J Mar Biotechnol* 3:256–263
- Ferrier-Pagès C, Boisson F, Allemand D, Tambutti E (2002) Kinetics of strontium uptake in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Mar Ecol Prog Ser* 245:93–100
- Fuhrman JA, Chisholm SW, Guillard RRL (1978) Marine alga *Platymonas* sp. accumulates silicon without apparent requirement. *Nature* 272:244–246
- Hajimahmoodi M, Faramarzi MA, Mohammadi N, Soltani N, Oveisi MR, Nafissi-Varcheh N (2010) Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J Appl Phycol* 22:43–50
- Harrison JP, Berges AJ (2005) Marine culture media. In: Andersen RA (ed) *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic, NY, p 578
- Herbert D, Phipps PJ, Strano RE (1971) Chemical analysis of microbial cells. In: Norris JR, Robbons DW (eds) *Methods in microbiology*. Academic, NY, pp 209–234
- Kochert G (1978) Physiological and biochemical methods. In: Halle-bust A, Craigie JS (eds) *Handbook of phycological methods*, vol 2. Cambridge University, Cambridge, pp 95–97
- Lee SH, Chang DU, Lee BJ, Jeon YJ (2009) Antioxidant activity of solubilized *Tetraselmis suecica* and *Chlorella ellipsoidea* by enzymatic digests. *J Food Sci Nutr* 14:21–28
- Li M, Xu J, Liu Z, Xu J (2004) Strontium stress on marine microalgae *D. inornata* growth and antioxidant enzymes activities. *Oceanol Limnol Sinica* 5:1121–1125
- Li M, Xie X, Xue R, Liu Z (2006) Effects of strontium-induced stress on marine microalgae *Platymonas subcordiformis* (Chlorophyta: Volvocales). *Chinese J Oceanol Limnol* 24(2):154–162
- Lu F, Foo LY (1995) Phenolic antioxidant components of evening primrose. In: Ong ASH, Niki E, Packer L (eds) *Packer, nutrition, lipids, health, and disease*. American Oil Chemists' Society, Champaign, USA, pp 86–95
- Marsh JB, Weinstein DB (1966) Simple charring method for determination of lipids. *J Lipid Res* 7:574–576
- McLachlan J (1973) Growth media-marine. In: Stein JR (ed) *Handbook of phycological methods and growth measurements*. Cambridge University, Cambridge, pp 25–52
- Mendoza H, De la Jara A, Carmona D, Freijanes PK (2010) Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. *Aquacult Int* 18:189–199
- Nichols HW (1973) Growth media-freshwater. In: Stein JR (ed) *Handbook of phycological methods and growth measurements*. Cambridge University, Cambridge, pp 25–52
- Otero A, Fábregas J (1997) Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture* 159:111–123
- Plaza M, Herrero M, Cifuentes A, Ibañez E (2009) Innovative natural functional ingredients from microalgae. *J Agric Food Chem* 57:7159–7170
- Rodolfi L, Chini ZG, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici M (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102:100–112
- Rodríguez-García I, Guil-Guerrero JL (2008) Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chem* 108:1023–1026
- Roessler PG (1988) Effects of silicon deficiency on lipid composition and metabolism in the diatom *cyclotella cryptica*. *J Phycol* 24:394–400
- Sato N, Murata N (1988) Membrane lipids. *Methods Enzymol* 167:251–259
- Seixas P, Rey-Méndez M, Valente LMP, Otero A (2008) Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture* 283:83–91
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144–158
- Summerhayes CP, Thorpe SA (1996) *Oceanography an illustrated guide*. Prentice Hall, New York
- Thomas WH, Seibert DLR, Alden M, Neori A, Eldridge P (1984) Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures: II. *Dunaliella primolecta* and *Tetraselmis suecica* experiments. *Biomass* 5:211–225
- Zhu CJ, Lee YK (1997) Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *J Appl Phycol* 9:189–194

ANEXO 2



**Effect of culture scale-up and strontium addition on
antioxidant activity of *Tetraselmis suecica* grown in a
semicontinuous culture**

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Bioprocess and Biosystems Engineering</i> |
| Manuscript ID: | BPBSE-11-0421 |
| Type of Manuscript: | Original Paper |
| Date Submitted by the Author: | 02-Dec-2011 |
| Complete List of Authors: | Ulloa, Gabriela; Instituto Tecnológico de Sonora, Biotecnología y Ciencias Alimentarias |
| Keywords: | Antioxidant activity, Bioreactors, <i>Tetraselmis suecica</i> , Polyphenols, Strontium |
| | |

- 1 Gabriela Ulloa^{a*}, Marivel Sánchez^a, Jorge Sineiro^a, Herminia Domínguez^c, Jaime Fábregas^b, María José
2 Núñez^a
3
4 Effect of culture scale-up and strontium addition on antioxidant activity of *Tetraselmis suecica* grown in a
5 semicontinuous culture
6
7 ^a Department of Chemical Engineering, Technical School of Engineering, University of Santiago de
8 Compostela, Av. Lope Gómez de Marzoa s/n, 15782, Santiago de Compostela, Spain.
9 ^b Department of Microbiology, Pharmacy school, University of Santiago de Compostela, Av. Praza
10 Seminario de Estudos Galegos s/n, 15782, Santiago de Compostela, Spain.
11 ^c Department of Chemical Engineering, University of Vigo (Ourense Campus), Polytechnic building, As
12 Lagoas, 32004, Ourense, Spain.
13
14 Antioxidant capacity of *T. suecica*
15
16 Abstract
17
18 The advantage to work with microalgae is that the production of interesting metabolite through
19 modification of growth conditions can be induced. Marine microalga *T.suecica* was grown in different
20 volume reactors (80 mL, 5 L, and 80 L) with or without strontium (Sr) addition to culture medium.
21 Methanol, ethanol and methanol-water (50%) solvents were used to performance the antioxidant
22 compounds extraction. Both, free radical scavenging methods (DPPH and TEAC) showed a high
23 antiradical activity in the extracts. The highest DPPH scavenging was achieved for 5 L reactor
24 (81.9±2.5%), whereas for the 80 L reactor was 60%. Lipid peroxidation β-carotene bleaching was
25 assessed in the extracts, reached at the highest activities coefficient for 80 L reactor (ethanol extract);
26 antioxidant activities were little affected by Sr addition, but it was affected by scale-up. Extractable solids

* Corresponding author: Gabriela Ulloa. Permanent address: Department of Biotechnology and Food
Science. Sonora Institute of Technology, Antonio Caso s/n, 85135, Ciudad Obregón, México. Tel:
+526444109000. Fax: +526444109001. E-mail: rulloa@itson.mx

Bioprocess and Biosystems Engineering

were maximized in 80 L reactor (350 ± 6 mg/g DW for methanol-water) whereas phenolics compounds were higher for ethanol extracts (5.5 ± 0.1 mg GAE/g DW for both 5 and 80 L reactors, without Sr). The results shown, that *T. suecica* is a natural source of antioxidant compounds that could be used in food, health and cosmetics.

Keywords: Antioxidant activity, bioreactors, polyphenols, strontium, *Tetraselmis suecica*.

Introduction

In aerobic organisms, the reactive oxygen species (ROS) are essential to produce energy, detoxification, chemical signal and immune function; but their overproduction in the human body or an exposition to external oxidant substances, so as failure in the defence mechanism could damage biomolecules such as DNA, lipids and proteins [1]. This damage is associated with an increased risk of cardiovascular diseases, cancer and other chronic diseases and the polyphenols, fatty acids, pigments, tocopherols, ascorbic acid and antioxidants enzymes are some examples of compounds with antioxidant activity that prevent this damages in living cells [2]. Free radical scavenging activity of extracts from microalgae is a potential alternative to prevent oxidation-associated conditions [3]. In addition, the extract contains several functional compounds such as protein, carbohydrates, mycosporines, and minerals [4]. Different procedures have been established and reported in the literature to obtain the microalgae extract such as enzymatic digestion [4], supercritical extraction [2], pressurized liquid extraction [5], and subcritical water extraction [6]. Likewise, a wide spectrum of solvents has been referenced to carry out a suitable microalgae extraction (water, methanol, ethanol, hexane and ethyl acetate) [7].

Tetraselmis suecica can be cultivated massively with low production costs, and mainly, the biomass is used as food for molluscs and bivalves in aquaculture systems [8]. Recently, the microalgae extract application open a new focus, approaching the bioactive compounds to fight against the pernicious ROS in the organisms when overproduced. In addition, *T. suecica* extract has shown its antioxidant potential as free radical scavenger, lipids peroxidation protector [4] and also contains antioxidant enzymes: for all these reasons it constitutes a natural source of antioxidants and it acts as a new and promising alternative of this kind of products.

On the one hand, it has been showed that dramatic changes in the biochemical composition of microalgae can be induced through the use of semi-continuous culture techniques and media composition, which have been used to produce microalgal biomass of constant and controlled composition [8-10]. On the other hand, it is well known that heavy metals present in the growth of microalgae and other microorganisms should produce metal stress and can generate free radicals or can be pro-oxidants; in this way, both culture and reactor (different scales) can influence the production of the biomass. The presence of elements as strontium (Sr) induced oxidative stress in *Platymonas (Tetraselmis) subcordiformis* which increased the antioxidant activity [11].

In previous works of our group, *T. suecica* was cultured in semi-continuous regime with 40% of renewal rate and with Sr addition at the culture medium in concentrations from 0 to 10 mM; the results showed that Sr 0.1mM promotes a steady-state with a high cell density, 65% more than control. Also, the addition of Sr 10 mM induced a high antioxidant activity, 2.6 times higher than control and a large correlation coefficient with total polyphenols content [12]. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of the Sr addition to the culture medium, so as the culture scale-up on antioxidant potential of *T. suecica* by antiradical inhibition and lipid peroxidation assays.

71

72 **Materials and methods**

73

74 **Cultivation of *T. suecica***

75

Tetraselmis suecica was cultured in a control medium which was prepared with sterilized seawater with 3.5% salinity enriched with nutrients [13] and the other condition was the control medium with strontium ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) at 10 mM concentration. Cultures were carried out in reactors with different volumes: 80 ml glass tubes bioreactor (control=CT and with strontium=SrT), 5 L balloon flask (control=CB and with strontium=SrB) and 80 L methacrylate prismatic bioreactor (150 x 60 x 10 cm). In the latter only control treatment (CR) was carried out, because the medium with strontium formed a film on the surface of pH sensor and aeration channel, prevent the proper functioning of both. The bioreactors were inoculated at cell density of $2 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ in a semi-continuous culture with 40% renewal rate in cyclostat regime with 12 hours light and 12 hours dark periods [14] and light intensity of $220 \mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($1.09 \times 10^{-8} \mu\text{mol quanta} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), $450 \mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($1.09 \times 10^{-8} \mu\text{mol quanta} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) and $596 \mu\text{mol}$

Bioprocess and Biosystems Engineering

86 quanta·m⁻²·s⁻¹ (5.17×10^{-8} μmol quanta·cell⁻¹·s⁻¹) for each bioreactor, respectively, provided by a
87 continuous, cool white, fluorescent light source. The temperature was kept at 20°C, and stirring was
88 achieved with airflow (3.5 vvm (volume of air per volume broth per minute) in 80 ml reactor, 1 vvm in 5
89 L reactor and 0.056 vvm in 80 L reactor) enriched with CO₂ during light period in order to keep the pH in
90 a range of 7 to 8 to 80 ml and 5 L bioreactor; the pH was controlled by automatically injecting pure CO₂,
91 as needed in 80 L bioreactor. The microporous sparger used for injecting CO₂ was different than the main
92 gas diffuser; this prevented mixing of CO₂ with the main air supply and enhanced the mass transfer of
93 CO₂. Cultures were kept in a semi-continuous regime for 30 days. The biomass was recovered by
94 centrifugation (3900 g for 10 min) and freeze at -20°C immediately to be lyophilized.

95

96 Cell density and growth rate of the microalga

97

98 Cell density was measured daily at first hour of light by microscope cell counting using an Improved
99 Neubauer haematocytometer. The specific growth rate was measured and obtained from the logarithmic
100 growth phase over 1–10 days of semi-continuous culture.

101

102 Microalga extracts preparation

103

104 About 1g of lyophilized biomass was placed in a glass flask and extracted with 33 ml of methanol-water
105 (50%), methanol and ethanol (all solvents are from Panreac, Barcelona, Spain). The mixture was stirred in
106 a vortex for 30s and placed in ultrasound (Elmasonic S40H, Germany) on ice, for 45 min. The extract was
107 centrifuged (Sigma laborzentrifugen, Germany) at 360 g for 10 min and the supernatant was collected and
108 filtered through a 0.45μm, type Millex GN filter (Millipore, USA). Total extractable solids were
109 calculated as the percentage of the dry weight of extract to the dry weight of lyophilized *T. suecica* used
110 for the extraction.

111

112 Determination of polyphenols content

113

114 Total polyphenols content was determined by Folin-Ciocalteu method [15]; 0.5 mL of extract was added
115 to 3.75 distilled water, 0.25 mL of Folin-Ciocalteu (Panreac, Barcelona, Spain) diluted 1:1 with water and

0.5 mL of 10% solution of Na_2CO_3 (Panreac, Barcelona, Spain). After incubation at room temperature for 1 h, the absorbance was measured at 760 nm in a Jasco V-530 UV-visible spectrophotometer. Gallic acid (Sigma, St. Louis, Mo, USA) was used as standard (0 to 100 ppm). The polyphenols content was represented as mg gallic acid equivalents (GAE)/g dry biomass.

Antiradical assays

DPPH free-radical scavenging was determined by Brand-Williams et al. [16] method to analyze the hydrogen-donating ability of the crude extract. A volume of 980 μL of a methanolic solution $6 \times 10^{-5}\text{M}$ of DPPH (Sigma- Aldrich, Spain) was added to 20 μL of sample extract; the bleaching of DPPH was followed at 515 nm in a Jasco V-530 UV-visible spectrophotometer. The inhibition percentage (IP) of the DPPH radical was calculated as the percent of absorbance reduction after 16 min with respect to the initial value, defined as $[(A_0 - A/A_0) \times 100]$, where A_0 and A are the initial and final absorbance.

The method used for Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was proposed by Re et al. [17], and is based on the scavenging of ABTS radical (2, 2'-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate)) (Fluka, Germany). ABTS radical cation ($\text{ABTS}^{+\cdot}$) was produced by reacting 7 mM ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulfate (Sigma, St. Louis, Mo, USA). The mixture was allowed to stand in the dark at room temperature for 12-16 h before use and then diluted with phosphate buffer saline (PBS) pH=7.4 to an absorbance of 0.7 at 734 nm and equilibrated at 30°C. After addition of 1 mL of diluted $\text{ABTS}^{+\cdot}$ solution to 10 μL of antioxidant compounds, the absorbance readings were taken at 1 min intervals up to 6 min; appropriate solvent blanks were run in each assay. The inhibition of absorbance at 734 nm was calculated as a function of the concentration of extracts and expressed as mmol Trolox.

Lipid peroxidation assay: β -carotene bleaching

This method was proposed by Miller [18]. The oxidative bleaching of β -carotene in a β -carotene/linoleic acid emulsion was measured using the following procedure: 1 mL of a solution prepared with 2.0 mg sample of crystalline β -carotene in 10 mL of chloroform was pipette into a flask containing 20 mg of purified linoleic acid and 200 mg of Tween 40. After removing chloroform by evaporation, 50 mL of

Bioprocess and Biosystems Engineering

oxygenated and distilled water were added to the flask under vigorous stirring, and 5 mL aliquots of the emulsion formed were pipette into the tubes containing 0.2 mL of methanolic, ethanolic or methanol-water extract of the sample. The test and control tubes were covered with a stopper and placed in a water bath at 50 °C. Absorbance readings at 470 nm were taken at 120 min. The antioxidant activity was measured by the Antioxidant Activity Coefficient (AAC), calculated as $AAC = [(A_{ext\ 120\ min} - A_{c\ 120\ min}) / (A_{c\ 0\ min} - A_{c\ 120\ min}) \times 1000]$, where A_{ext} is the extract absorbance and A_c is the control absorbance.

Pigments content

The chlorophyll and carotenoids were extracted of 3 mg freeze-dried biomass with 5 ml of acetone: methanol (2:1 v/v). The samples were 24 h on darkness at 4°C for the complete extraction of the pigments. The extracts were clarified by centrifugation (2000g by 10 min) and then the absorbance was measured at 480, 664 and 647 nm in a Jasco V-530 spectrophotometer. The content of pigments was estimated according to the formula established by Jeffrey and Humphrey [19]:

Chlorophyll a ($\mu\text{g/ml}$) = $11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$

Chlorophyll b ($\mu\text{g/ml}$) = $20.36 A_{647} - 5.50 A_{664}$

Total carotenoids ($\mu\text{g/ml}$) = $4 A_{480}$, where A is the absorbance of the sample at different wavelength.

Fucoanthin and β -carotene analysis

Carotenoids extraction was made according to Subagio et al. [20]. Briefly, 250 mg of freeze-dried biomass was weight in an assay tube, after adding 6.6 ml of hexane:acetone:ethanol (2:1:1) and with stirring for 24 h in darkness. Then, 0.33 ml of methanolic KOH (40%) was added, keeping 8 h at room temperature. It was filtered through a membrane pore size of 0.45 μm , put into separating funnel and it was washed 3 times with water; the upper phase was transferred to another tube and dried under nitrogen. The residue was re-suspended in 0.5 ml of methanol and filtered through a membrane of pore size 0.45 μm . The identification was made according to Mínguez-Mosquera and Hornero-Sánchez [21], 50 μl were injected in a HPLC at 1.2 ml/min flow rate, acetone being the mobile phase A and water the mobile phase B, the program was started in 25% B (0 - 5 min), after changing to 5% B (5 - 10 min), and maintaining so from 10 to 20 min. Column temperature was 30°C and wavelength 450 nm. The identification was made

176 by comparing the retention time of the standards of fucoxanthin (0 – 80 µg/ml) and β-carotene (0 -
177 800µg/ml).

178

179 **Alpha-tocopherol content**

180

181 The determination of α-tocopherol content was carrying out according to Sánchez-Machado et al. [22].
182 Briefly, 0.25 g of freeze-dried biomass was weighed out in a screw top assay tube. 200 µl of
183 pyrocatechol solution (1 g in 5 ml of methanol) and 5 ml of KOH solution (0.5 M in methanol) were
184 added and stirred in a vortex for 20 min. The tubes were placed in a bath at 80°C for 15 min, stirring
185 every 5 min for 15 s. After cooling in ice water, 1 ml of distilled water and 5 ml of hexane were added
186 and the mixture was stirred for 1 min, and then centrifuged for 2 min at 373g. The upper phase was
187 transferred to another tube and dried under nitrogen. The residue was re-dissolved in 1 ml of HPLC
188 mobile phase, then membrane filtered (pore size 0.45 µm; Millipore, MA, USA). 50 µl were injected into
189 the HPLC column heating at 30°C, with mobile phase methanol:acetonitrile (30:70 v/v) isocratic at flow
190 of 1 ml/min, and the detection was at 205 nm. The identification and quantification were made by
191 comparing the retention time of the standard of α-tocopherol with a range curve from 3 - 120 µg/ml.

192

193 **Statistics Analysis**

194

195 Experimental data for each response variable was analyzed by ANOVA using the GLM procedure (SPSS
196 version 15 for Windows 2006). When main factors were significant, an adequate *post-hoc* test (Tukey-
197 test) was performed. When the second-order interactions were significant, simple comparisons of a factor
198 between levels of another factor were performed using the Bonferroni test. The correlation between
199 polyphenols content and antioxidant activities was determined by Pearson's linear correlation procedure
200 using the SPSS software package.

201

202 **Results and discussion**

203

204 Growth rate of microalga

205

Bioprocess and Biosystems Engineering

206 The culture scale-up and Sr addition to medium were evaluated in the growth and antioxidant activity of
207 *T. suecica*; in this way, although the scale-up was in different configuration of bioreactors, the possible
208 factors were analyzed. All the Sr cultures achieved cell densities until 23% higher than control cultures in
209 the 2 scales tested (Table 1).

210 On one hand, 80 mL bioreactor cultures of *T. suecica* were carried out in control medium with N-NO₃ at
211 2, 4 and 8 mM concentration, and the maximal growth rate and the maximal cell density in the stationary
212 phase were achieved at 4 mM concentration as it is depicted in Fig. 1. On the other hand, 80 mL and 5 L
213 bioreactors cultures of *T. suecica* were carried out in this last condition and with addition of Sr at 10 mM
214 concentration; the growth rate and cell density in 80 ml culture were better than 5 L bioreactor and not
215 remarkable differences were observed in cultures with and without Sr (Fig. 2). Since the industrial
216 production in a bioreactor is the ultimate objective of any biological process to the production of
217 metabolites of industrial interest, it is advisable to approach the scaling-up on a laboratory scale
218 bioreactors. As noted above, 80 L bioreactor culture was carried out in control medium with N-NO₃ at 4
219 mM concentration (Fig. 3). The aim of culture scale-up was to produce biomass of *T. suecica* and then
220 characterize their antioxidant potential to study the effect of scaling-up of the culture on this variable. The
221 growth rate and steady-state cell density were strongly affected by culture scale-up, as descended from 2
222 day⁻¹ to 0.285day⁻¹ and from 8.0 to 4.99x10⁶ cell•mL⁻¹, respectively. Is a fact that the cell density and
223 growth rate were affected by variables present in the scaling-up of the culture as aeration and mechanic
224 stress; in this way the aeration was decreasing with increasing bioreactor volume from 3.5 to 0.056 vvm.
225 In this way, in microalga *Isochrysis galbana* initial cell damage with high aeration was found but after a
226 while the transfer of gas increased and produced greater growth [23]. Also in a reactor too high, there
227 would be greater pressure on the bottom than at the top, creating a pressure differential that could cause
228 cell damage [24]. Moreover, an increasing productivity of the bubble column with increasing aeration rate
229 was attributed to improve mixing, which caused frequent movement of cells from the darker core of the
230 reactor to the better illuminated periphery, phenomena that might occur in the used reactors [25]; may be
231 these factors affected cell density and growth rate of *T. suecica*.

232 Additionally, we attempted to microalgal growth model by fitting a logistic equation. The mathematical
233 foundation of such biological systems allows for abstractions from the real elements of the systems and
234 the basic components of the calculation, which facilitates the verification of interesting properties of
235 modeled systems and result in an easier process control. The logistic model applied is shown in Equation

1, where X is the biomass (cell mL^{-1}) at time t (h), X_0 and X_{\max} (cell mL^{-1}) are the initial biomass concentration and maximum μ is the specific growth rate (h^{-1}).

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + e^{\left[\ln \left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1 \right) - \mu t \right]}} \quad (\text{Eq. 1})$$

The experimental data were fitted to the logistic model using the software SigmaPlot 2001 version 7101 (SPSS Inc.) which used the Marquardt-Levenberg algorithm to determine the parameter values. The values that define the model are presented in Table 1. In all cases it found an excellent fit of this model to experimental data, as shown by the values of the regression coefficients obtained (very close to one), and the results confirm the conclusions previously obtained.

Total extractable solids and polyphenols content

Total extractable solids mean values of *T. suecica* are presented in the Figure 4a, as mg extract g^{-1} dry weight ($\text{mgExt} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$). Both, volume reactor and solvent type were significant factors on total extractable solids, the order of decreasing capacity to extract soluble materials was methanol-water > methanol > ethanol; this shows that the extractable solids are compounds of polar nature. On other hand, as mean, the order of decrease for producing extractable soluble materials was CR > CB > CT > SrB > SrT for all solvents used. In general, solids extractable were higher in control cultures than Sr cultures. This trend indicates that the extractable solids could be of polar nature. In general, extractable solids were significant higher in control cultures (CR, CB and CT) than those cultures with Strontium (SrB and SrT) (Figure 4a). This evidence indicates that this metal had a negative effect on extractable solids independent of solvent extraction, this could be due to Sr was assimilated increasing the mineral content of cell, decreasing the organic content of microalga [12]; also, in this sense, the addition of high concentration of strontium to the incubation medium caused the breakdown of both chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in *Platymonas* (*Tetraselmis*) *subcordiformis*; the loss in chlorophyll content could be due to the peroxidation of chloroplast membranes[26]. Also, Sr had a marked influence of plasma membrane fatty acid composition of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* increased physiological uptake of a metal ion in a microorganism [27]. On other hand, reactor scale-up improve the extractable solid content in the *T. suecica*. The extractable solid yields (from 23 to 36%) by enzymatic digestion of *T. suecica* were similar to those finding in this present work (34%) [4]. However, currently are being developed new methods for

Bioprocess and Biosystems Engineering

265 preparing extracts of microalgae, as pressurized liquid extraction (PLE) that under certain conditions
266 improves up to 40% the levels of extractable solids [5-6].
267 The mean values of total polyphenols as mg gallic acid equivalent/g dry weight biomass (mg GAE·g⁻¹
268 DW) are showed in the Figure 4b. In the greater volume reactors (CR and CB), the higher total
269 polyphenols were extracted with both solvents: ethanol or methanol. However, the methanol-water (50%)
270 mix was the worst solvent, because the polyphenols content means were significant lower than those for
271 ethanol and methanol, as can be seen in the Figure 4b. In addition, note that strontium had no negative
272 effect on poyphenols content from tube cultures (SrT or CT), but in the bottle culture (SrB) had it. The
273 selective solvent order to extract phenolic compounds was the following: ethanol> methanol> methanol-
274 water. This sequence was inversely to that observed for extractable solids; thus, in those methanol-water
275 extracts the amount of polyphenols was the third part with regarding to that found in ethanol extract.
276 Furthermore, the culture scale-up had a positive effect on polyphenols content; the highest mean values of
277 total polyphenols were obtained in the CB and CR cultures (Figure 4b). The polyphenols mean values
278 measured in samples from tube cultures (SrT and CT) and extracted with ethanol or methanol were
279 statistically equals, this evidence indicates that the strontium did not affect the polyphenols extraction, but
280 in the samples from CB and SrB did it (Figure 4b). This showed that the culture system used, in addition
281 to medium composition affected the composition of microalga, although care in details as irradiance
282 intensity and pH control were taken (because it are photosynthetic organisms). However, in the
283 production of microalgae, culture conditions have been demonstrated as a key factor to improve
284 productivity and for the fine tuning of biochemical composition of microalgal biomass [8, 28]. Also,
285 semi-continuous culture techniques have been used to produce microalgal biomass of controlled
286 composition [10, 29]. On the other hand, polyphenols content in ethanol and methanol extracts were
287 higher than in enzymatic extracts of *T. suecica* [4].

288

289 **Antioxidant activities assays**

290

291 **DPPH radical scavenging activity**

292 DPPH inhibition results are shown in Figure 5a. The analysis of variance indicated that the maximum
293 DPPH inhibition percentage was achieved for extracts from *T. suecica* CB and SrB cultures and 50% v/v
294 methanol-water (81.9 ± 2.5 and 80.2 ± 1.7). This finding is not in agreement with the low content of

polyphenols found in the same treatments (Figure 4b), which indicates that the compounds responsible for DPPH scavenging activity from *T. suecica* were not mainly polyphenols. Furthermore, Pearson's correlation coefficient between DPPH inhibition and polyphenols content was low and not significant (Table 2). Hajimahmoodi et al. [3] found a small correlation coefficient between DPPH and polyphenols content in microalgae extracts. In other organism as macroalgae a significant correlation between DPPH inhibition and polyphenols content has been reported [30].

It has been reported in the literature values of DPPH inhibition of 70% for extracts obtained by enzymatic procedures of *T. suecica* [4], and also a wide range of DPPH inhibition have been showed by other microalgae, where the maximum was nearly to 100% of inhibition in water extract of a sequential extraction with hexane, ethyl acetate and water of *Chlorella vulgaris* [3]. Other cellular components such as proteins, polyunsaturated fatty acids and some pigments have shown antioxidant activity in other microalgae [4]. In our work, the best solvent extraction was methanol-water, because the highest DPPH inhibition percentage (80%) was found in this extract; thus, *T. suecica* biomass may likely be a good natural source of antioxidant extracts.

ABTS^{•+} radical decolourisation assay (TEAC method)

The antioxidant capacity was assessed by TEAC method, being the values expressed as mM Trolox equivalent (Fig. 5b). ANOVA results indicated that the mean equivalent Trolox concentration from samples extracted with methanol were the highest and statistically equals, excepting for SrB treatment (Fig. 5b). Furthermore, these antioxidant capacities were independent of culture volume, but solvent was a very important factor. It is remarkable that CB with methanol-water treatment (white bar from Fig. 5b) showed a mean Trolox value statistically equal to those obtained by extraction with methanol. As an explanation to this observation, it can be noted that the polyphenols content of the above-mentioned treatment, obtained with methanol-water mixture, was much higher than the other ones obtained with the same solvent (Figure 4b). On the other hand, the presence of Strontium in the treatment SrB with methanol was a negative factor, because its mean value of Trolox concentration was significantly lower than that for CB with methanol. However, this fact was not consistent with CT and SrT treatments using methanol as solvent, because strontium had no effect on antioxidant activity (Figure 5b) in these treatments. In addition, Pearson's correlation coefficient between TEAC values and polyphenols content was high and significant ($P < 0.01$) for methanol and methanol-water solvents (Table 2). This result

Bioprocess and Biosystems Engineering

indicates that polyphenolic compounds were the main molecules involved in the response of antioxidant capacity measured as TEAC values. But in ethanol extracts the antioxidant activity was caused by compounds different to polyphenols.

This correlation has been very small in other microalgae using different solvents as hexane, ethyl acetate and water [7]; for example, in *Chlorella vulgaris*, the 50% of the total antioxidant potential (TEAC activity) was attributed to molecules as carotenoids and chlorophylls, particularly lutein, chlorophylls *a* and *b*, and pheophytin *a*, that were the most abundant antioxidants in the extracts. In addition, 23% of antioxidant activity was attributed to hydrophilic compounds content that not has been identified [5]. However, the variety in the biochemical composition and the capacity of microalgae to produce a wide range of antioxidant compounds is the basis of the diversity in the antiradical activity. Also, it was surprising that among species or strains the same family grow in similar conditions, could exhibit very different radical scavenging ability [7]. It may be due to growth conditions; it is known that the presence of metals in the culture medium cause stress in the cell. If this effect is added to increase the pressure of the culture medium by increasing the reactor volume, it could increase the stress in the cells, inducing greater antioxidant compounds.

β-Carotene bleaching assay

The β-carotene protecting activity was assessed and expressed as antioxidant activity coefficient (AAC), being the values shown in Figure 5c. Both factors “reactor volume” and “type of solvent” were significant ($P < 0.01$). The highest AAC mean values were obtained for CB and CR using ethanol as solvent, being methanol the second better solvent and the worst one was the methanol-water mix. Those extracts obtained from treatment SrT and SrB showed significantly lower AAC mean values than those from CT and CB samples, which were extracted with ethanol and methanol. This result indicates that Strontium could be involved in mechanisms that lead to the biosynthesis of secondary metabolites, causing cell stress. However, the activity coefficients showed by *T. suecica* extracts were very small compared with the coefficient showed by *Chlorella vulgaris* (AAC=25000) and other microalgae [31].

Pearson’s correlation coefficient between β-carotene and polyphenols content in methanol and ethanol solvent were significant and high (0.87, 0.74, $P < 0.001$) (Table 2). On the other hand, the correlation coefficients between total polyphenols content and AAC of β-carotene were large in methanol and ethanol extracts (Table 2) and the activity was attributed to polyphenols content. Also extracts of

355 *Tetraselmis tetrahele* and other microalgae were active in inhibiting the lipid peroxidation, by which
356 these microalgae might contain the active compounds for protection from lipid peroxidation; also
357 *Spirulina maxima* ethanol extracts showed a significant increase in phenolic concentration that led to a
358 progressive lipid peroxidation protection [32, 33].

359 Contrary to antiradical assays, in β -carotene bleaching, the molecules with capacity to prevent the lipid
360 peroxidation were less polar due that ethanol extracts were the most active, maybe lipophilic compounds
361 as pigments, sterols, fatty acids, and other. On the other hand, the Sr addition to culture medium was not
362 significant the difference from control medium; although, it is known that the presence of high
363 concentrations of metals in the culture medium cause stress in the cell [11].

364 Also, the other variable evaluated was the culture scale-up, in this way all the extracts of the biomass of
365 *T. suecica* grown in 5 L bioreactor were more active on antiradical activity and lipid peroxidation
366 protection, decreasing at lower and higher scale. Light intensity per cell and pH were controlled, the
367 airflow was the only different variable in all reactors and their effect in the antioxidant activity was great.
368 The airflow was 3.5 vvm, 1 vvm and 0.056 vvm in 80 ml, 5 L and 80 L bioreactor, respectively; in this
369 way, in slightly aerated systems with CO₂ supplementation, the dissolved oxygen produced by
370 photosynthesis activity was higher [34]; moreover high levels of dissolved oxygen in microalgal cultures
371 inhibited photosynthesis [35] and this can cause the production of ROS promoting high antioxidant
372 activity on microalgae.

373 The result to all antioxidant assays (DPPH, TEAC and β -carotene bleaching) showed this trend. Although
374 80 ml reactors achieved the maximal cell density and decreased with increase the volume of bioreactor;
375 this is due to aeration flows in each reactor [34, 36], being inversely to antioxidant activity. A high air
376 flow displaces the dissolved oxygen produced in the dark phase of photosynthesis avoiding the oxygen
377 accumulation and the inhibition of the microalgae growth. Also the different pressure present along the
378 tall reactor can be a contributing factor to cellular stress and in this condition the antioxidant activity
379 could be promoted in the biomass. In this case, 80 L bioreactor is a very tall reactor (1.5 m in height)
380 would have a higher pressure at the bottom than at the top, creating a differential pressure which might
381 cause cell stress [24]. Also, the addition of high concentration of strontium to the incubation medium
382 caused the breakdown of both chlorophyll-*a* and chlorophyll-*b* in *P. subcordiformis*. The loss in
383 chlorophyll content could be due to the peroxidation of chloroplast membranes, this results indicate that
384 strontium accumulation increased oxidation stress, which is also evident from increased lipid peroxidation

Bioprocess and Biosystems Engineering

and change of fatty acid components. The peroxidation of membrane lipids is one of the most damaging effects of this oxidative stress caused by exposure of alga cells to high metal concentration [26]. On one hand, the solvents used to extract preparation have different polarity: 0.762, methanol; 0.654, ethanol, and 1.0, water; so the polarity of methanol-water mixture was greater than that of pure methanol [37]; the antioxidant assays showed the polar nature of the molecules that have a function on each one.

Pigments and α -tocopherol

Total pigments content of *T. suecica* biomass indicated that it is rich in chlorophyll and carotenoids, being fucoxanthin and β -carotene the main ones of these latter. The culture system used affected the content and variety of pigments; in this way, the maximum chlorophyll and carotenoids content was in CR followed by CB y CT (Table 3); founding a high Pearson correlation ($P > 0.94$) between the culture scale-up and all pigments and tocopherol. Also, this correlation was higher between culture scale-up and antioxidant activities, indicating that the antioxidant potential of *T. suecica* can be due to content of pigments and tocopherol together polyphenols. On other hand, Sr affected negatively the total pigments content with the lowest content of both, but the contents of fucoxanthin and β -carotene were higher in the biomass growth in Sr presence.

The pigment content may explain the high antioxidant activity of some extracts that showed a small correlation with polyphenols content. Several microalgae species has showed a considerable antioxidant activity representing a high potential as natural source of compounds with this property; however, the advantage to produce this kind of compound from microalgae is that their composition is greatly affected and can be controlled by the culture conditions, and the scale up does not the exception; in this work was demonstrated that variation on the reactor volume had a great impact in both the antioxidant activity and the polyphenols content of the biomass, due to that two of the most important parameters as irradiance intensity and pH were carefully controlled. In this way, other microalgae as *Phaedactylum tricornutum* was grown on different reactors with the same volume and shape but with different air flow streams affecting the productivity, the cell density and fatty acid composition [38]; different renewal rate, carbon source, and nutrient concentration affected some microalgae as *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus almeriensis*, *Haematococcus pluvialis* [8, 14, 39]. Metals presence in the culture media are necessary for the microalgae, but when in excess, may generate oxidative stress by inducing production of reactive

oxygen species via its toxic effects on photosynthesis and hence serious damages to macromolecules; in this way, expectations were that Sr in excess (10 mM) caused high levels of antioxidant activity [40]. On the other hand, α -tocopherol content was lower in biomass cultured with Sr. Also, in CR biomass all pigments and phytosterol was higher than rest of treatments, proving to be a recommended condition for growing *T. suecica* when it want to encourage the production of these compounds.

CONCLUSIONS

The culture scale-up to produce *T. suecica* biomass affected their antioxidant potential, being better the culture in 5 L reactor. Use high concentration of strontium (10 mM) decreased the antioxidant activity, contrarily to expect because it ought to produce a metal-stress state. However, high fucoxanthin and β -carotene content were induced with Sr; although total carotenoids, chlorophylls and α -tocopherol were negatively affected. This represents an opportunity to improve the content of pigments and compounds in microalgae to increase its antioxidant potential, representing a source of natural substances with applications in food, health and pharmacy. It can also take advantage of *T. suecica* that is able to grown in the presence of high concentrations of strontium and could be used in the treatment of seawater contaminated with this metal, while it produced metabolites with high value added such as the compounds with antioxidant activity.

References

1. Aruoma OI, Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* **75**:199-212 (1998).
2. Wang HM, Pan JL, Chen CY, Chiu CC, Yang MH, Chang HW and Chang JS, Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Process Biochem* **45**:1865–1872 (2010).
3. Hajimahmoodi M, Faramarzi MA, Mohammadi N, Soltani N, Reza OM and Nafissi-Varcheh N, Valuation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J Appl Phycol* **22**:43–50 (2010).
4. Lee SH, Chang DU, Lee BJ and Jeon YJ, Antioxidant activity of solubilized *Tetraselmis suecica* and *Chlorella ellipsoidea* by enzymatic digests. *J Food Sci Nutr* **14**:21-28 (2009).

Bioprocess and Biosystems Engineering

- 446 5. Cha KH, Kang SW, Kim CY, Um BH, Na YR and Pan CH, Effect of pressurized liquids on extraction
447 of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *J Agric Food Chem* **58**:4756–4761 (2010).
- 448 6. Rodríguez-Meizoso I, Jaime L, Santoyo S, Señoráns FJ, Cifuentes A and Ibáñez E, Subcritical water
449 extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *J*
450 *Pharm Biomed Anal* **51**:456–463 (2010).
- 451 7. Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F and Jiang Y, Evaluation of antioxidant capacity and
452 total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *J Food Chem* **102**:771–776 (2007).
- 453 8. Fábregas J, Otero A, Domínguez A and Patiño M, Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica*
454 changes the biochemical composition of *Artemia species*. *Mar Biotechnol* **3**:256-263 (2001).
- 455 9. Fábregas J, Patiño M, Vecino E, Cházaro F and Otero A, Productivity and biochemical composition of
456 cyclostat cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *J Appl Microbiol Biotechnol* **43**:617-621
457 (1995).
- 458 10. Seixas P, Rey-Méndez M, Valente MPL and Otero A, Producing juvenile artemia as prey for *Octopus*
459 *vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture*
460 **283**:83–91 (2008).
- 461 11. Mei L, Xitao X, Renhao X and Zhili L, Effects of strontium-induced stress on marine microalgae
462 *Platymonas subcordiformis* (Chlorophyta: Volvocales). *Chin J Oceanol Limnol* **24**:154-162 (2006).
- 463 12. Ulloa G, Otero A, Sánchez M, Sineiro J, Núñez MJ, and Fábregas J. Effect of Mg, Si and Sr on
464 growth and antioxidant activity of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *J Appl Phycol* DOI:
465 10.1007/s 10811-011-9764-2 (2011).
- 466 13. Fábregas J, Herrero C, Cabezas B and Abalde J, Mass culture and biochemical variability of the
467 marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*
468 **49**:231-244 (1985).
- 469 14. Otero A and Fábregas J, Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured
470 semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture* **159**:111-123
471 (1997).
- 472 15. Singleton VL and Rossi JA, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic
473 acid reagents. *Am J Enol Vitic* **16**:144–158 (1965).
- 474 16. Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C, Use of a free radical method to evaluate antioxidant
475 activity. *J Food Sci Technol* **28**:25-30 (1995).

- 476 17. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C, Antioxidant activity
477 applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**:1231-1237
478 (1999).
- 479 18. Miller HE, Simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* **48**:91 (1971).
- 480 19. Jeffrey SW and Humphrey GF, New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*,
481 *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanz* **167**:191-194 (1975).
- 482 20. Subagio A, Morita N and Sawada, Carotenoids and their fatty acids esters in banana peel. *J Nutr Sci*
483 *Vitaminol* **42**:553-566 (1996).
- 484 21. Mínguez-Mosquera MI and Hornero-Méndez D, Separation and quantification of the carotenoid
485 pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. *J Agric*
486 *Food Chem* **41**:1616-1620 (1993).
- 487 22. Sánchez-Machado DI, López-Hernández J and Paseiro-Losada P, High-performance liquid
488 chromatographic determination of α -tocopherol in macroalgae. *J Chromatogr A* **976**:277–284 (2002).
- 489 23. Falinsky KA. Effects of different aeration conditions on *Isochrysis galbana* (T-iso) CCMP 1324 in a
490 bench-scale photobioreactor. Master Thesis. Faculty of the Graduate School of Cornell University, USA
491 (2009).
- 492 24. Barbosa, M.J. Hydrodynamic stress and lethal events in sparged microalgae cultures. *Biotechnol*
493 *Bioengineer* **83**:112-120 (2003).
- 494 25. Sánchez-Mirón A, Cerón-García MC, Contreras-Gómez A, García-Camacho F, Molina-Grima E, and
495 Chisti Y. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi
496 steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem Engineer J* **16**:287–297 (2003).
- 497 26. Li M, Xie X, Xue R, Liu Z Effects of strontium-induced stress on marine microalgae *Platymonas*
498 *subcordiformis* (Chlorophyta: Volvocales). *Chinese J Oceanol Limnol* **24**:154-162 (2006)
- 499 27. Avery SV, Smith SL, Mohamad-Ghazi A and Hoptroff MJ. Stimulation of strontium accumulation in
500 linoleate-enriched *Saccharomyces cerevisiae* is a result of reduced Sr^{2+} Efflux. *Appl Environ Microb*
501 **65**:1191–1197 (1999).
- 502 28. D'Souza FML and Kelly GJ, Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on
503 growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. *Aquaculture*
504 **181**: 311–329 (2000).

Bioprocess and Biosystems Engineering

- 505 29. Fábregas J, Patiño M, Morales E, Cordero B and Otero A. Optimal renewal rate and nutrient
506 concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in semicontinuous
507 cultures. *Appl Environ Microbiol* **62**:266-268 (1996).
- 508 30. Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Pulido R and Saura-Calixto F, Antioxidant activity of fresh and
509 processed edible seaweeds. *J Sci Food Agric* **81**:530-534 (2001).
- 510 31. Rodríguez-García I and Guil-Guerrero JL, Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal
511 species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chem* **108**:1023–1026
512 (2008).
- 513 32. Natrah FMI, Yusoff FM, Shariff M, Abas F and Mariana NS, Screening of Malaysian indigenous
514 microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *J Appl Phycol* **19**:711–718 (2007).
- 515 33. Abd El-Baky HH, El Baz FK and El-Baroty GS, Production of phenolic compounds from *Spirulina*
516 *maxima* microalgae and its protective effects *in vitro* toward hepatotoxicity model. *Afr J Pharm*
517 *Pharmacol* **3**:133-139 (2009).
- 518 34. Fábregas J, Ferrón L, Gamallo Y, Vecino E, Otero A and Herrero C. Improvement of growth rate and
519 cell productivity by aeration rate in cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour*
520 *Technol* **48**:107-111 (1994).
- 521 35. Contreras-Flores C, Peña-Castro JM, Flores-Cotera LB, and Cañizares- Villanueva RO. Avances en el
522 diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia* **28**:450–456 (2003).
- 523 36. Vega-Estrada J, Montes-Horcasitas MC, Domínguez-Bocanegra AR, and Cañizares-Villanueva RO.
524 *Haematococcus pluvialis* cultivation in split-cylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration
525 conditions avoiding cell damage. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 31–35(2005).
- 526 37. Reichart C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chem. Rev* **94**:2319-2358 (1994).
- 527 38. Fernández SJM, Cerón GMC, Sánchez MA, Belarbi EH, García CF and Molina GE, Pilot-plant-scale
528 outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricornutum* using glycerol in vertical bubble column and
529 airlift photobioreactors: studies in Fed-batch mode. *Biotechnol Prog* **20**:728-736 (2004).
- 530 39. Sánchez JF, Fernández-Sevilla JM, Acién FG, Cerón MC, Pérez-Parra J and Molina-Grima E,
531 Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and
532 temperature. *J Appl Microbiol Biotechnol* **79**:719–729 (2008).
- 533 40. Morelli E and Scarano G, Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in
534 the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Sci* **167**:289-296 (2004).

Table 1. Parameters from a logistic model characterizing cultures of *T. suecica* at different scales and with varying nitrogen concentrations and Sr addition.

| Scale | Nitrogen source | Sr addition | X_0 | X_{\max} | μ | R^2 |
|------------------|-----------------|-------------|-------|------------|-------|-------|
| 80 mL bioreactor | 2 mM | - | 2.01 | 5.96 | 0.65 | 0.97 |
| | 4 mM | - | 2.09 | 8.90 | 2.00 | 0.96 |
| | 8 mM | - | 1.69 | 7.67 | 0.68 | 0.90 |
| | 2 mM | 10 mM | 1.80 | 6.49 | 1.75 | 0.97 |
| | 4 mM | 10 mM | 1.76 | 9.05 | 1.66 | 0.96 |
| | 8 mM | 10 mM | 1.67 | 9.64 | 1.47 | 0.96 |
| 5 L bioreactor | 4 mM | - | 2.0 | 6.52 | 1.09 | 0.93 |
| 5 L bioreactor | 4 mM | 10 mM | 2.73 | 8.04 | 0.67 | 0.97 |
| 80 L bioreactor | 4 mM | - | 0.72 | 4.99 | 0.29 | 0.90 |

Bioprocess and Biosystems Engineering

Table 2. Pearson's correlation coefficient among total polyphenols concentration (TPC) extracted with solvents (ethanol, methanol and methanol-water (50%) and their DPPH radical scavenging, TEAC and β -carotene bleaching activities.

| | Extracts | | |
|------------|----------|---------|----------------|
| | Methanol | Ethanol | Methanol-water |
| DPPH | 0.71* | 0.45 | 0.70** |
| TEAC | 0.93** | 0.07 | 0.97** |
| B-Carotene | 0.86** | 0.77** | - 0.73** |

*Significant at level $P \leq 0.05$

** Significant at level $P \leq 0.01$

Table 3. Pigments and α -tocopherol content in *T. suecica* biomass cultured in different volume bioreactors with and without Sr addition. α -tocopherol, fucoxanthin and β -carotene are represented as $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry biomass and Chlorophyll and total carotenoids are presented as $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dry biomass.

| | Phytosterol | Chlorophyll | | | Carotenoids | | |
|------------|----------------------|------------------|------------------|----------------------|----------------|-------------------|----------------------|
| | α -tocopherol | Chlorophyll a | Chlorophyll b | Total chlorophyll | Fucoxanthin | β -carotene | Total carotenoids |
| CT | 49.5 \pm 3.2 | 7.5 \pm 0.08 | 1.2 \pm 0.01 | 8.7 \pm 0.7 | 10.2 \pm 0.9 | 278 \pm 35.5 | 2.7 \pm 0.02 |
| SrT | 34.3 \pm 2.9 | 4.9 \pm 0.04 | 1.1 \pm 0.01 | 6.0 \pm 0.3 | 34.0 \pm 1.2 | 579.5 \pm 76.6 | 1.7 \pm 0.01 |
| CB | 29.2 \pm 3.1 | 7.6 \pm 0.07 | 2.0 \pm 0.02 | 9.6 \pm 0.7 | 4.6 \pm 0.1 | 312.0 \pm 20.1 | 2.9 \pm 0.03 |
| SrB | 24.2 \pm 1.9 | 5.0 \pm 0.04 | 1.0 \pm 0.07 | 5.6 \pm 0.5 | 9.0 \pm 0.3 | 501.6 \pm 48.6 | 1.5 \pm 0.01 |
| CR | 101.9 \pm 8.5 | 9.3 \pm 0.07 | 3.5 \pm 0.02 | 12.8 \pm 1.1 | 28.1 \pm 3.9 | 591.4 \pm 9.3 | 4.7 \pm 0.05 |

542 Figure legends

543 **Figure 1** Experimental (symbols) and modelling (line) data of cultures of *T. suecica* in 80 mL reactor
544 with varying nitrogen concentrations (○) 2 mM-N, (△) 4 mM-N, (□) 8 mM-N.

545 **Figure 2** Experimental (symbols) and modelling (line) data of cultures of *T. suecica* in control medium
546 (triangle symbols, 4 mM-N) and Sr addition (circle symbols, 4 mM-N + Sr 10 mM). Open symbols:
547 culture in 80 ml reactor; closed symbols: culture in 5 L reactor.

548 **Figure 3** Experimental (symbols) and modelling (line) data of cultures of *T. suecica* in 80 L reactor.

549 **Figure 3** Effect of size culture reactor of *T. suecica* and solvent extraction on total extractable solids (a)
550 and total polyphenols (b) (● methanol, ● ethanol, and ○ methanol/water (50%)). Means values ± SE,
551 n=3.

552 **Figure 5** Antioxidants assays: a) DPPH inhibition; b) TEAy c) β-carotene bleaching in methanol (■),
553 ethanol (■) and methanol-water (□) extracts of *T. suecica* growth with or without Sr in different
volume bioreactors. Numbers on the bars represents significant difference (Tukey p<0.05)

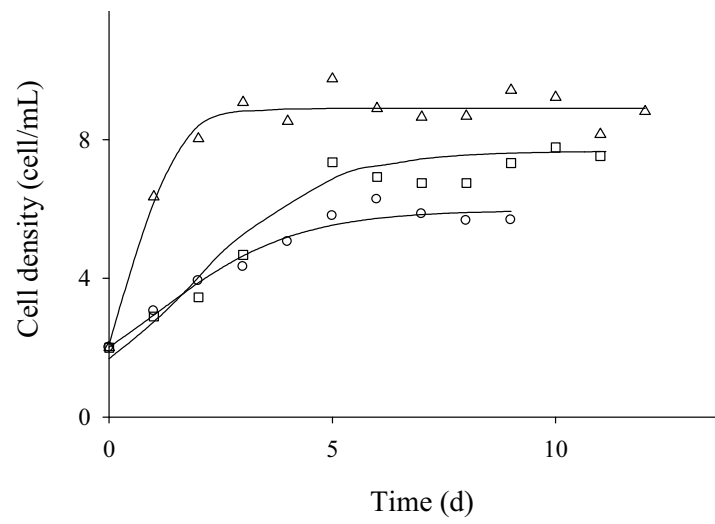


Figure 1

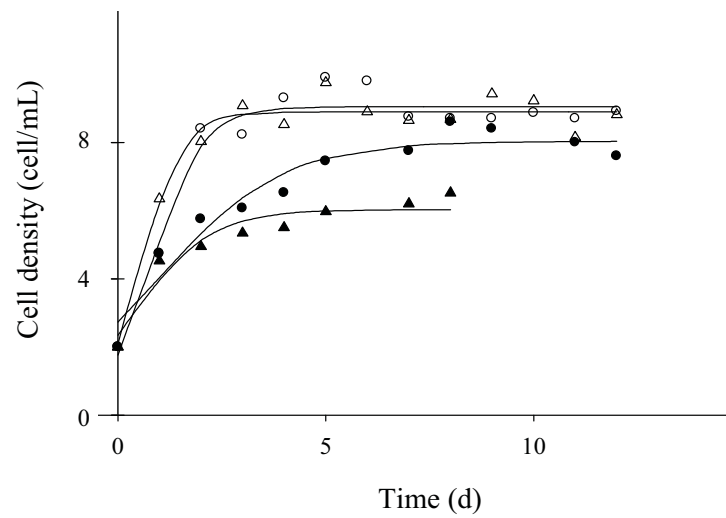


Figure 2

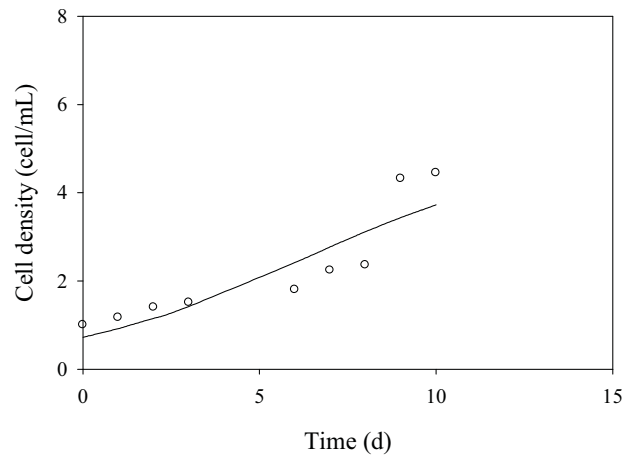


Figure 3

Bioprocess and Biosystems Engineering

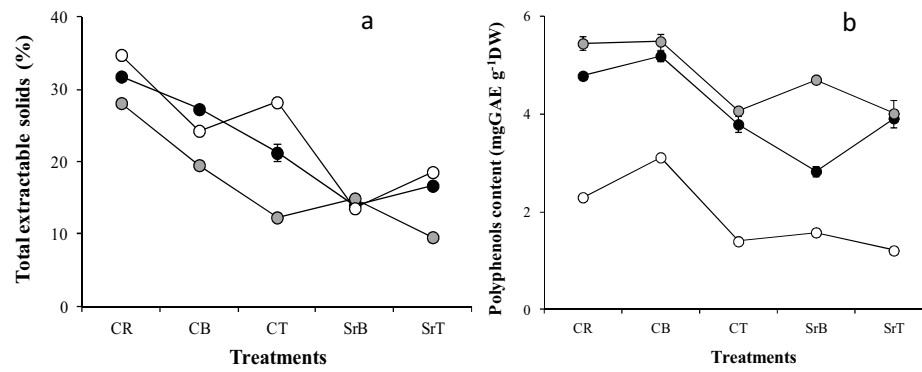


Figure 4

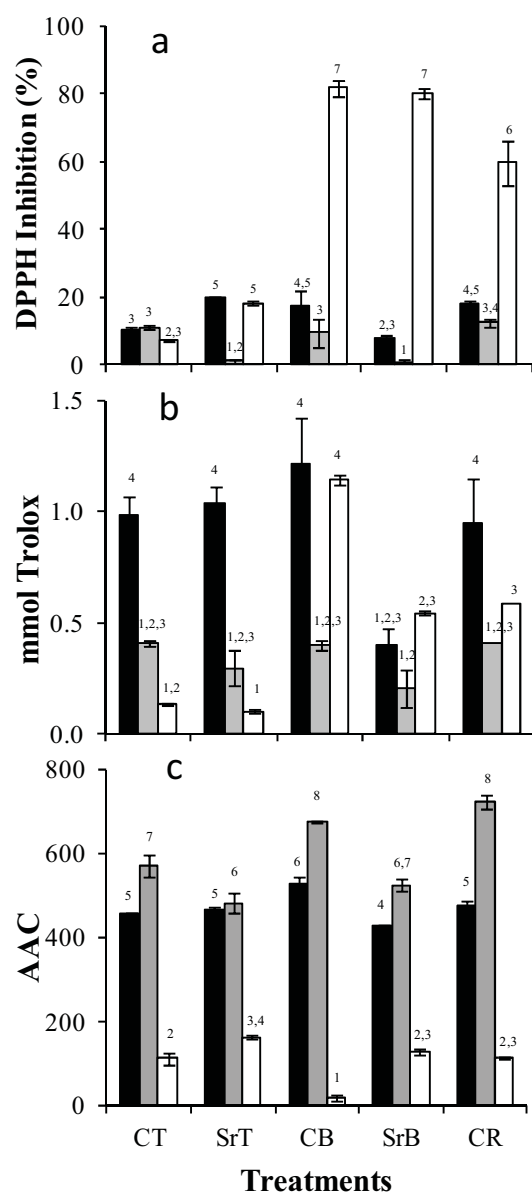


Figure 5

ANEXO 3



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

J. Chem. Thermodynamics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jct

Sodium salt effect on aqueous solutions containing Tween 20 and Triton X-102

G. Ulloa^{a,b}, C. Coutens^a, M. Sánchez^a, J. Sineiro^a, A. Rodríguez^c, F.J. Deive^{a,c,*}, M.J. Núñez^a^a Department of Chemical Engineering, Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain^b Instituto Tecnológico de Sonora, 85130, Ciudad Obregón, Sonora, Mexico^c Department of Chemical Engineering, Universidade de Vigo, P.O. Box 36310, Vigo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2011

Received in revised form 26 September 2011

Accepted 27 September 2011

Available online xxxx

Keywords:

Aqueous two-phase systems

Tween 20

Triton X-102

Inorganic salts

Hofmeister series

ABSTRACT

The effect of six different high charge density sodium inorganic salts, such as Na_2CO_3 , Na_2SO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Na_2SO_3 , Na_2HPO_4 and NaCH_3COO , in aqueous solutions of two anionic surfactants Tween 20 and Triton X-102 was investigated at $T = 298.15$ K and atmospheric pressure. The results were qualitatively analyzed in the light of the Hofmeister series. Also, a quantitative thermodynamic analysis in terms of molar Gibbs free energy of hydration ($\Delta_{\text{hyd}}G$) was carried out. The Merchuck equation was used to correlate the solubility curves and the tie line data were modelled by applying the Othmer–Tobias and Bancroft equations.

© 2011 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The increasing interest in the development of more efficient and environmentally sustainable extraction processes has promoted the use of separation methods such as aqueous two-phase systems (ATPS). To date, several kinds of ATPS involving polymers [1], ionic liquids (ILs) [2] and surfactants [3] have been described. In this case, the surfactant-based ATPS possesses advantages, such as a lower interface tension in comparison with the other cases, lower cost (surfactants and inorganic salts are inexpensive), less amount of inorganic salt required to induce phase splitting, null flammability, experimental conveniences (all the components are commercially available at bulk quantities), and shorter time for phase disengagement [4].

One of the advantages of using ATPS is that the Hofmeister series can be employed to predict the salting out potential of a specific inorganic salt. This series initially established the strength of salts, ordering them from kosmotrophic (water structuring) to chaotropic (water destructuring). At this moment, it has been demonstrated that the bulk water structure is not central to the Hofmeister effect. The rationale behind this phenomenon (two aqueous phases that become immiscible) underlies the complex

competition between the inorganic salt and the surfactant for the water molecules and the existence of specific interactions between the formers. Thus, liquid–liquid extraction utilizing ATPS has attracted considerable attention for the recovery and purification of a plethora of chemicals and bioproducts such as proteins [5–8], alkaloids [9], organic compounds [10,11], or antibiotics [12].

The strategy followed in this study consisted of investigating the ability of Na_2CO_3 , Na_2SO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Na_2SO_3 , NaH_2PO_4 and NaCH_3COO , as high charge density inorganic salts with different lyotropic degree, to act as phase promoters in aqueous solutions of both Tween 20 and Triton X-102.

On the one hand, these surface active compounds were selected for this work as representatives of two of the main families of surfactants: polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) and polyoxyethylene t-octylphenol (Triton X-102). Both of them are widely used in the food industry, household detergents, cosmetics, pharmaceuticals, oil lubricants, paper production, textile processing, paints and coatings and are classified as readily biodegradable. On the other hand, sodium salts were selected for this study due to their demonstrated salting out ability, as predicted by their relative position in the Hofmeister series. This aspect was demonstrated taking into account the hydration ability and the intensity of the phase forming capacity. Finally, empirical equations were used to correlate the solubility curves and tie-line data. The agreement between experimental and correlated data was analyzed in terms of regression analysis.

* Corresponding author at: Department of Chemical Engineering, Universidade de Vigo, P.O. Box 36310, Vigo, Spain. Tel.: +34 881 816792.

E-mail addresses: deive@uvigo.es, franciscojavier.deive@usc.es (F.J. Deive).

TABLE 1Binodal data for {Tween 20 (1) + salt (2) + H₂O (3)} two-phase systems at $T = 298.15$ K as a function of mass fraction of the components.

| Na ₂ CO ₃ | | Na ₂ SO ₄ | | Na ₂ S ₂ O ₃ | | Na ₂ SO ₃ | | NaH ₂ PO ₄ | | NaCH ₃ COO | |
|---------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|---|----------------|---------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| w ₂ | w ₁ | w ₂ | w ₁ | w ₂ | w ₁ | w ₂ | w ₁ | w ₂ | w ₁ | w ₂ | w ₁ |
| 0.28 | 56.50 | 0.03 | 59.35 | 0.00 | 77.48 | 0.23 | 57.02 | 0.96 | 61.33 | 3.93 | 74.20 |
| 0.10 | 59.41 | 0.65 | 51.92 | 0.49 | 66.93 | 0.56 | 53.99 | 3.46 | 50.63 | 8.90 | 59.98 |
| 1.41 | 48.11 | 2.58 | 41.98 | 2.38 | 55.49 | 1.81 | 46.90 | 3.64 | 50.43 | 10.96 | 51.81 |
| 1.75 | 46.62 | 4.71 | 29.65 | 5.99 | 38.65 | 2.31 | 41.75 | 5.15 | 44.01 | 12.74 | 46.47 |
| 2.07 | 42.98 | 5.02 | 27.42 | 7.57 | 28.78 | 4.16 | 32.88 | 5.28 | 43.67 | 13.24 | 45.74 |
| 2.14 | 42.74 | 5.51 | 24.64 | 8.09 | 27.71 | 4.41 | 31.79 | 6.44 | 38.34 | 14.13 | 40.60 |
| 2.41 | 39.55 | 5.92 | 22.02 | 8.46 | 26.12 | 5.35 | 24.99 | 6.79 | 35.96 | 15.54 | 35.59 |
| 2.49 | 38.75 | 6.29 | 19.80 | 9.39 | 21.25 | 5.70 | 22.84 | 7.62 | 33.14 | 16.54 | 32.48 |
| 3.49 | 31.66 | 6.53 | 18.27 | 9.91 | 18.99 | 6.02 | 20.00 | 8.33 | 31.11 | 17.84 | 26.57 |
| 3.97 | 27.95 | 6.86 | 16.22 | 10.31 | 16.63 | 6.33 | 18.26 | 9.02 | 27.63 | 18.90 | 23.30 |
| 4.01 | 24.84 | 7.20 | 14.01 | 10.96 | 13.86 | 6.73 | 15.53 | 10.56 | 20.51 | 19.63 | 19.61 |
| 4.62 | 22.22 | 7.59 | 11.18 | 11.28 | 12.04 | 7.01 | 13.51 | 11.31 | 16.48 | 20.81 | 16.87 |
| 4.92 | 19.93 | 7.82 | 9.84 | 11.67 | 10.37 | 7.26 | 11.61 | 11.69 | 13.98 | 21.08 | 14.49 |
| 5.26 | 14.94 | 7.99 | 8.28 | 12.02 | 8.76 | 7.60 | 9.49 | 12.25 | 11.95 | 22.31 | 12.22 |
| 5.46 | 13.07 | 7.54 | 13.04 | 12.19 | 7.05 | 7.86 | 7.57 | 12.98 | 9.81 | 22.39 | 10.68 |
| 5.46 | 14.80 | 8.51 | 7.79 | 12.23 | 6.70 | 7.99 | 6.25 | 13.30 | 8.82 | 28.00 | 2.67 |
| 5.49 | 13.26 | 8.59 | 6.59 | 15.21 | 1.87 | 8.15 | 5.13 | 13.55 | 7.46 | 29.26 | 1.74 |
| 5.87 | 9.90 | 8.87 | 5.47 | 17.10 | 0.53 | 8.16 | 4.95 | 15.86 | 3.09 | 31.17 | 0.85 |
| 6.20 | 6.54 | 9.06 | 4.13 | 16.43 | 0.85 | 9.77 | 1.93 | 17.46 | 1.32 | | |
| 6.34 | 5.32 | 9.22 | 3.24 | | | 11.37 | 0.36 | 18.92 | 0.53 | | |
| 6.51 | 3.93 | 9.39 | 2.51 | | | 12.09 | 0.14 | | | | |
| 7.70 | 1.815 | 9.77 | 2.49 | | | | | | | | |
| 9.24 | 0.206 | 11.21 | 0.85 | | | | | | | | |
| 10.19 | 0.035 | 13.62 | 0.05 | | | | | | | | |

TABLE 2Binodal data for {Triton X-102 (1) + salt (2) + H₂O (3)} two-phase systems at $T = 298.15$ K as a function of mass fraction of the components.

| Na ₂ CO ₃ | | Na ₂ SO ₄ | | Na ₂ S ₂ O ₃ | | Na ₂ SO ₃ | | NaH ₂ PO ₄ | | NaCH ₃ COO | |
|---------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|---|----------------|---------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| w ₂ | w ₁ | w ₂ | w ₁ | w ₂ | w ₁ | w ₂ | w ₁ | w ₂ | w ₁ | w ₂ | w ₁ |
| 1.25 | 47.72 | 0.34 | 45.12 | 1.23 | 54.47 | 0.39 | 42.84 | 1.22 | 64.10 | 10.92 | 48.92 |
| 1.38 | 47.37 | 0.55 | 43.43 | 2.67 | 47.72 | 0.95 | 38.86 | 2.19 | 57.33 | 11.69 | 41.88 |
| 1.41 | 45.83 | 2.80 | 32.25 | 6.14 | 31.54 | 1.11 | 38.17 | 3.19 | 49.01 | 12.78 | 36.39 |
| 1.64 | 43.31 | 3.02 | 29.65 | 6.69 | 29.07 | 1.59 | 36.12 | 3.80 | 45.46 | 13.38 | 32.64 |
| 1.73 | 41.07 | 3.74 | 27.02 | 7.54 | 24.05 | 2.44 | 31.72 | 4.07 | 43.90 | 13.87 | 28.95 |
| 2.15 | 37.39 | 4.04 | 25.28 | 8.02 | 21.53 | 2.78 | 29.95 | 5.64 | 36.19 | 14.25 | 28.44 |
| 2.61 | 33.89 | 4.73 | 22.72 | 8.71 | 17.69 | 3.34 | 27.13 | 5.79 | 37.13 | 14.49 | 25.59 |
| 3.26 | 27.29 | 5.18 | 19.49 | 9.23 | 15.70 | 3.66 | 24.74 | 7.07 | 29.80 | 14.56 | 24.73 |
| 3.59 | 23.70 | 5.37 | 18.50 | 9.96 | 12.61 | 4.47 | 20.54 | 8.00 | 26.07 | 15.03 | 22.52 |
| 3.71 | 21.59 | 5.55 | 16.77 | 10.34 | 10.80 | 5.46 | 15.41 | 8.83 | 22.26 | 16.04 | 17.77 |
| 4.13 | 19.87 | 5.94 | 14.23 | 10.67 | 9.06 | 6.61 | 11.07 | 9.24 | 19.67 | 16.56 | 14.14 |
| 4.37 | 15.45 | 6.25 | 12.81 | 10.96 | 7.54 | 7.07 | 8.44 | 9.87 | 17.48 | 16.87 | 11.80 |
| 4.45 | 17.96 | 6.61 | 10.66 | 11.37 | 6.19 | 7.35 | 6.76 | 10.06 | 14.97 | 17.61 | 9.74 |
| 4.97 | 12.69 | 6.94 | 8.84 | 11.53 | 4.80 | 7.67 | 5.14 | 11.30 | 13.41 | 17.71 | 7.91 |
| 5.21 | 10.22 | 7.33 | 7.15 | 14.02 | 1.49 | 7.82 | 4.24 | 12.56 | 10.96 | 22.99 | 0.88 |
| 5.57 | 7.53 | 7.21 | 8.13 | 15.34 | 0.56 | 10.01 | 0.38 | 13.11 | 9.49 | 23.94 | 0.50 |
| 5.73 | 5.90 | 7.57 | 6.58 | 16.65 | 0.18 | 10.70 | 0.15 | 13.83 | 8.13 | 26.28 | 0.10 |
| 5.86 | 4.78 | 7.96 | 4.58 | | | 11.25 | 0.07 | 15.76 | 3.27 | | |
| 8.82 | 0.149 | 8.14 | 3.98 | | | | | 17.02 | 1.90 | | |
| 9.26 | 0.066 | 8.25 | 3.28 | | | | | 18.04 | 1.16 | | |
| 9.84 | 0.021 | 8.45 | 2.33 | | | | | | | | |
| | | 10.13 | 0.75 | | | | | | | | |
| | | 10.88 | 0.32 | | | | | | | | |
| | | 11.58 | 0.13 | | | | | | | | |

2. Experimental

2.1. Chemicals

The non-ionic surfactants polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) and polyoxyethylene t-octylphenol (Triton X-102) were purchased from Sigma–Aldrich, and used without further purification. Tween 20 possesses a critical micelle concentration (CMC) of 98.7 ppm and a HLB (Hydrophilic lipophilic balance) of 16.7. In the case of Triton X-102, the CMC and HLB are (267 ppm and 14.4) · 10^{−6}, respectively. The high charge density inorganic salts, Na₂CO₃, Na₂SO₄, NaCH₃COO (mass fraction purities ≥ 0.99)

and Na₂S₂O₃, Na₂SO₃, NaH₂PO₄ (mass fraction purities ≥ 0.98) were also purchased from Sigma–Aldrich and used as received.

2.2. Experimental procedure

The binodal curves of the ATPS were carried out by means of the cloud point titration method at $T = 298.15$ K and atmospheric pressure [13]. A known amount of salt was added to the two different surfactant aqueous solutions under constant stirring, until the detection of turbidity. Afterwards, a drop-wise addition of ultra-pure water until a clear monophasic region was carried out. The ternary system compositions were determined by the weight

quantification of all components within an uncertainty of $\pm 10^{-4}$ g. The measurements were carried out in a jacketed glass vessel containing a magnetic stirrer connected to a temperature controlled circulating bath (controlled to ± 0.01 K). For the jacketed cell, the temperature was controlled with a F200 ASL digital thermometer with an uncertainty of ± 0.01 K.

The determination of tie-lines (TLs) started with the addition of a ternary mixture within the immiscibility region of known mass fraction to the ampoules, the temperature was kept constant and the mixture was stirred vigorously and left to settle for 24 h to ensure a complete separation of the layers. The estimated uncertainty in the determination of the surfactant and salt phase mass compositions is less than 0.03%.

3. Results and discussion

The experimental solubility curves data in mass composition for the ternary mixtures of {surfactant (Tween 20 or Triton X-102) + salt (Na_2CO_3 , Na_2SO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Na_2SO_3 , Na_2HPO_4 , NaCH_3COO) + H_2O } at $T = 298.15$ K and atmospheric pressure are summarized in tables 1 and 2, and are graphically compared in figures 1 to 4. They provide information about the concentration of phase-forming components required to form two phases and their concentration in the top and bottom phases. From the information coming from the literature, it can be checked that very few solubility data for surfactant-based ATPS are available, and this paper constitutes the first time that the present systems have been investigated.

A visual inspection of the results allows one to conclude similar trends no matter the surfactant used. In both cases (Tween 20 and Triton X-102), the salting out ability of the selected high charge density inorganic salts follows the order: $\text{Na}_2\text{CO}_3 > \text{Na}_2\text{SO}_3 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 > \text{NaH}_2\text{PO}_4 > \text{NaCH}_3\text{COO}$.

This behaviour can be explained from two points of view. On the one hand, specific ion effects are ubiquitous in chemistry and many often exhibit a recurring trend called the Hofmeister series, which is generally more pronounced for anions than for cations. In these particular cases, since the cation is always the same (Na^+), it can be checked that the trend followed for every inorganic salt is similar to what is predicted by the Hofmeister series [14].

On the other hand, the ability of an anion to salt-out the surfactant can also be correlated to the lyotropic number of the anion. In

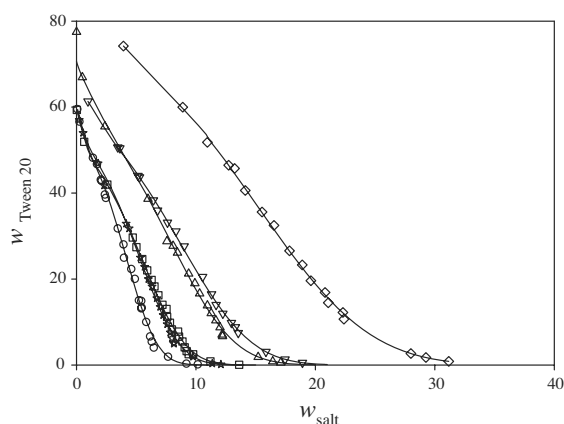


FIGURE 1. Plot mass fraction Tween 20 against mass fraction salt to show the experimental and correlated phase diagram of {Tween 20 (1) + salt (2) + H_2O (3)} at $T = 298.15$ K: \circ , Na_2CO_3 ; \square , Na_2SO_4 ; \triangle , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; \star , Na_2SO_3 ; ∇ , NaH_2PO_4 ; \diamond , NaCH_3COO .

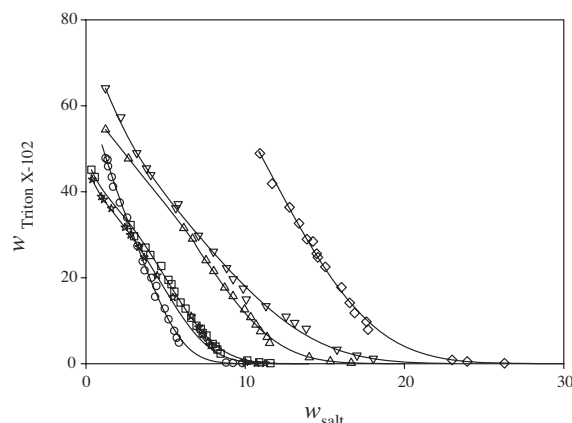


FIGURE 2. Plot of mass fraction Triton X-102 against mass fraction salt to show the experimental and correlated phase diagram of {Triton X-102 (1) + salt (2) + H_2O (3)} at $T = 298.15$ K: \circ , Na_2CO_3 ; \square , Na_2SO_4 ; \triangle , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; \star , Na_2SO_3 ; ∇ , NaH_2PO_4 ; \diamond , NaCH_3COO .

general, hydration radius, charge to size ratio, charge and lyotropic number can all be related to an ion Gibbs free energy of hydration ($\Delta_{\text{hyd}}G$), which can be a useful tool to verify quantitatively the experimental results obtained. Considering that the high charge density inorganic salts studied share a common cation, but contain different anions, it is easy to see that the salting out ability of the salts follows the order: $\text{CO}_3^{2-} (-1315 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}) > \text{SO}_3^{2-} (-1295 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}) > \text{SO}_4^{2-} (-1080 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}) > \text{H}_2\text{PO}_4^- (-465 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}) > \text{CH}_3\text{COO}^- (-365 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ [15]. This trend confirms that anions with higher phase promotion capacity show more negative $\Delta_{\text{hyd}}G$ values.

From the data obtained, it can also be concluded that the use of Triton X-102 entails the formation of larger biphasic regions for most of all the high charge density inorganic salts under study. This means that less salt is needed to form the phase splitting. The behaviour observed can be explained in the light of the different HLB values of Tween 20 and Triton X-102, which are 16.7 and 14.4, respectively. Traditionally, an increased hydrophobicity of the water destructuring (chaotropic) compound leads to greater immiscibility regions, probably as a result of the incompatibility between the phase-forming components. Following this trend, recent studies [16,17] have also converged upon the idea that more hydrophobic compounds (ILs and polyethylene glycols) entail binodal curves closer to the origin. This effect may be explained in terms of the existence of more favorable interactions between the inorganic salt ions with the polar regions of the IL/surfactant/polymer. The salting-out inducing ions display non-favourable interactions with the non-polar moieties, suggesting that the former have higher affinity for water and will lead more easily to phase disengagement.

The next step of the work consisted of fitting the experimental results to an empirical mathematical model developed by Merchuck *et al.* [18].

$$Y = A \exp \left\{ (BX^{0.5}) - (CX^3) \right\}, \quad (1)$$

where Y and X are the surfactant and inorganic salt mass composition, respectively, and A , B and C are the fitting parameters, which values are given in table 3, together with the standard deviations (σ), which were calculated by applying the following expression:

$$\sigma = \left(\frac{\sum_{i=1}^{n_{\text{DAT}}} (Z_{\text{exp}} - Z_{\text{adjust}})^2}{n_{\text{DAT}}} \right)^{1/2}, \quad (2)$$

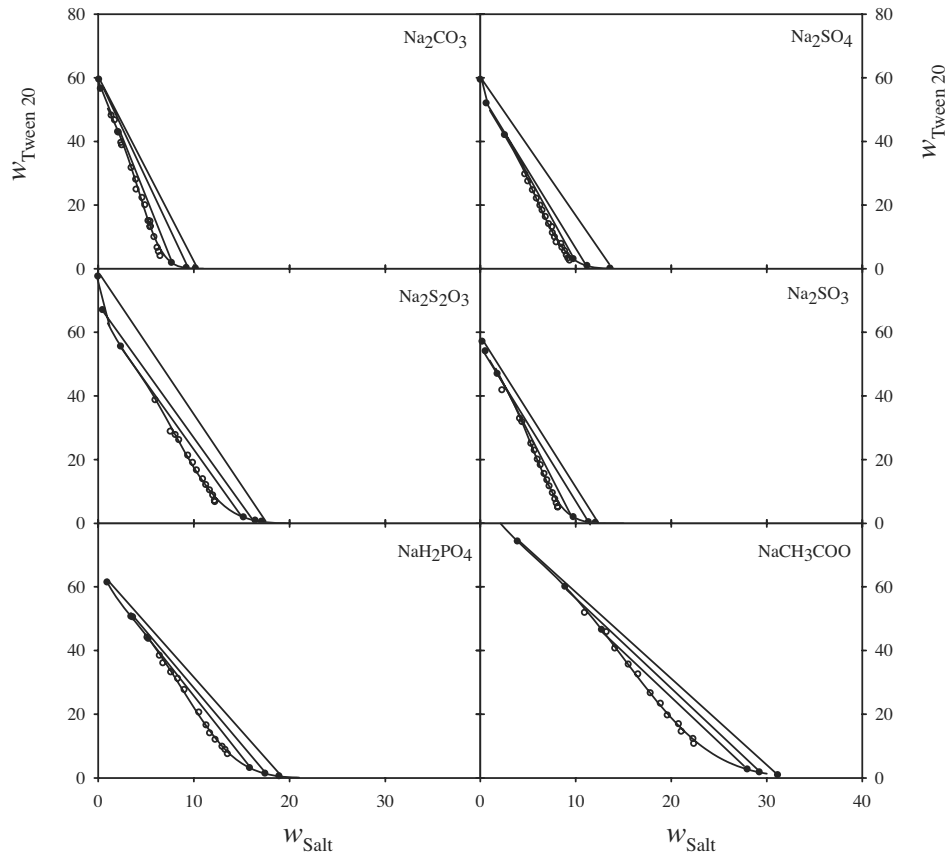


FIGURE 3. Plot of mass fraction Tween 20 against mass fraction salt to show the experimental and correlated phase diagram with experimental tie-lines of {Tween 20 (1) + salt (2) + H₂O (3)}: at $T = 298.15$ K. Void symbols represent experimental phase diagram, and full symbols represent tie-line data.

where the experimental and adjustable binodal values are represented by z_{exp} and z_{adjust} and n_{DAT} is the number of experimental data. On the basis of the deviations results, it is possible to conclude that the above mentioned equation is appropriate to reproduce satisfactorily the binodal curves of the studied systems.

The data for the TLs were obtained by the lever arm rule taking into account the relationship between the upper phase and the overall system mass composition.

$$Y_T = \frac{Y_F}{R} - \left(\frac{1-R}{R} \right) \cdot Y_B, \quad (3)$$

$$X_T = \frac{X_F}{R} - \left(\frac{1-R}{R} \right) \cdot X_B, \quad (4)$$

where F , T , and B represent the feed, the top phase, and the bottom phase, respectively; Y and X are the concentration of surfactant and salt, respectively; and R is the following measured ratio:

$$R = \frac{\text{Weight of the top phase}}{\text{Weight of the mixture}}. \quad (5)$$

In parallel, the information provided by the tie-line length, TLL , and the slope of the TLs data, S , are useful tools to ascertain the relative distribution of the surfactant and the inorganic salt between the two aqueous phases in equilibrium. These values are calculated by means of these equations:

$$TLL = \left[(w_1^I - w_1^{II})^2 + (w_2^I - w_2^{II})^2 \right]^{0.5}, \quad (6)$$

$$S = \frac{w_1^I - w_1^{II}}{w_2^I - w_2^{II}}, \quad (7)$$

where the equilibrium mass fraction of the surfactant (1) and the inorganic salt (2), in the upper (I) and bottom (II) phases, are represented. The TL data obtained for each ternary system and the above mentioned parameters are given in table 4, and represented in figures 3 and 4.

From the values obtained, a correlation of the salting out potential of every high charge density inorganic salt with the slope of the tie lines can be concluded. Hence, the use of high charge density inorganic salts with more salting out capacity such as Na_2CO_3 and Na_2SO_4 led to higher values of the slopes, and to an almost complete segregation of the surfactant to the upper phase, a fact coincident with what was recently reported by Deive *et al.* [2].

The next goal consisted of analyzing the thermodynamic consistency of the experimental TL data, through applying the Othmer-Tobias and Bancroft [19] correlations for each ATPS:

$$\log \left(\frac{100 - w_1^I}{w_1^I} \right) = a + b \log \left(\frac{100 - w_2^{II}}{w_2^{II}} \right), \quad (8)$$

$$\log \left(\frac{w_3^I}{w_2^I} \right) = c + d \log \left(\frac{w_3^I}{w_1^I} \right), \quad (9)$$

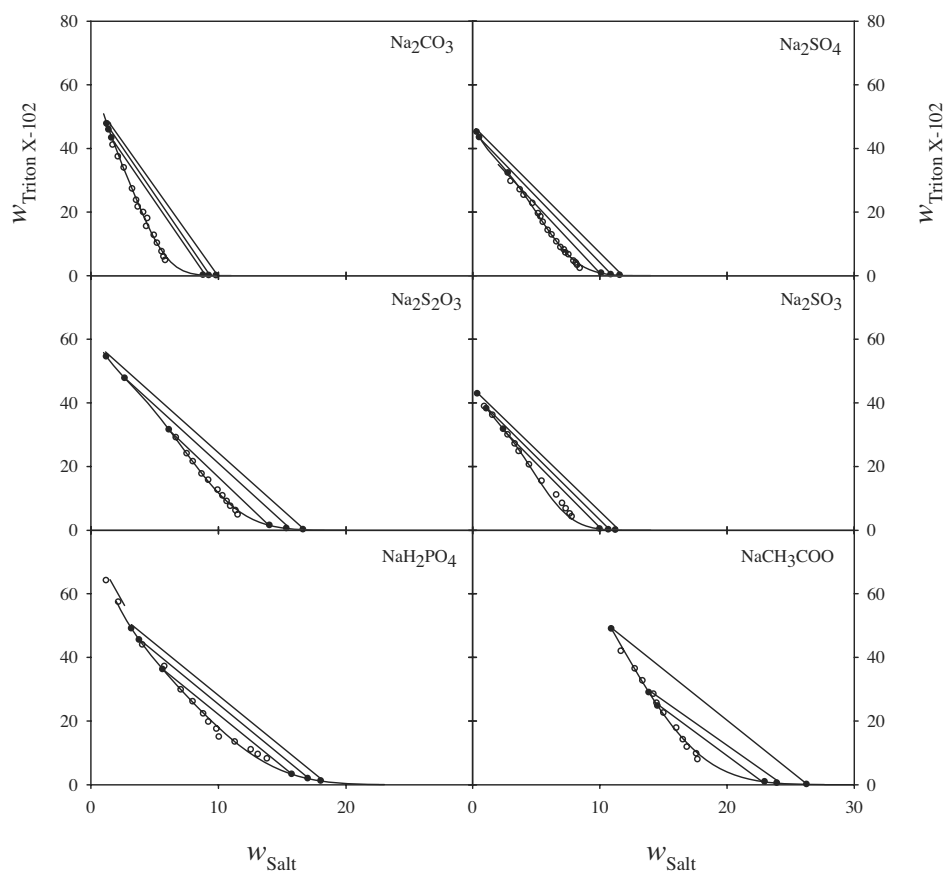


FIGURE 4. Plot of mass fraction Triton-X 102 against mass fraction salt to show the experimental and correlated phase diagram with experimental tie-lines of {Triton X-102 (1) + salt (2) + H₂O (3)}: at $T = 298.15$ K. Void symbols represent experimental phase diagram, and full symbols represent tie-line data.

TABLE 3

Parameters of Merchuck equation and standard deviation for {surfactant (1) + salt (2) + H₂O (3)} at $T = 298.15$ K.

| | <i>A</i> | <i>B</i> | <i>C</i> | σ |
|---|----------|----------|----------------------|----------|
| {Tween 20 (1) + Na ₂ CO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 63.89 | −0.232 | $6.38 \cdot 10^{-3}$ | 1.249 |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 61.73 | −0.213 | $2.53 \cdot 10^{-3}$ | 0.699 |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ S ₂ O ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 77.56 | −0.210 | $8.25 \cdot 10^{-4}$ | 0.822 |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ SO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 62.98 | −0.206 | $3.05 \cdot 10^{-3}$ | 1.096 |
| {Tween 20 (1) + NaH ₂ PO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 73.99 | −0.191 | $6.07 \cdot 10^{-4}$ | 0.674 |
| {Tween 20 (1) + NaCH ₃ COO (2) + H ₂ O (3)} | 96.22 | −0.127 | $1.33 \cdot 10^{-4}$ | 0.803 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ CO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 83.55 | −0.488 | $7.12 \cdot 10^{-3}$ | 0.999 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 51.93 | −0.241 | $3.33 \cdot 10^{-3}$ | 0.622 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ S ₂ O ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 69.21 | −0.214 | $1.10 \cdot 10^{-3}$ | 0.580 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ SO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 50.44 | −0.259 | $4.05 \cdot 10^{-3}$ | 1.352 |
| {Triton X-102 (1) + NaH ₂ PO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 101.02 | −0.396 | $4.75 \cdot 10^{-4}$ | 1.230 |
| {Triton X-102 (1) + NaCH ₃ COO (2) + H ₂ O (3)} | 103.02 | −0.084 | $3.59 \cdot 10^{-4}$ | 1.124 |

where a , b , c and d are the fitting parameters, w is the mass fraction, subscripts 1, 2 and 3 refer to surfactant, salt and water, respectively, and superscripts I and II indicate the surfactant-rich phase and salt-rich phase, respectively. These correlations relate the TL mass concentration of both phases to obtain a linear function. The fitting parameters and the regression coefficients

for the TL determined in the present work are shown in tables 5 and 6. On the basis of the obtained regression coefficients, both Bancroft and Othmer–Tobias equations reveal a high degree of consistency with the experimental data, except for the cases involving sulfate and thiosulfate, which confirms the validity of these correlations.

TABLE 4Experimental tie-lines in mass percentage for {surfactant (1) + salt (2) + H₂O (3)} at $T = 298.15$ K.

| Surfactant-rich phase | | Inorganic salt-rich phase | | TLL | S |
|---|---------|---------------------------|------------|-------|-------|
| w_1^I | w_2^I | w_1^{II} | w_2^{II} | | |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ CO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 56.50 | 0.28 | 0.206 | 9.24 | 57.00 | −6.28 |
| 59.41 | 0.10 | 0.035 | 10.19 | 60.23 | −5.88 |
| 42.74 | 2.14 | 1.815 | 7.70 | 41.30 | −7.36 |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 51.92 | 0.65 | 0.85 | 11.21 | 52.16 | −4.84 |
| 41.98 | 2.58 | 2.49 | 9.77 | 39.65 | −5.42 |
| 59.35 | 0.03 | 0.05 | 13.62 | 60.84 | −4.36 |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ S ₂ O ₃ (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 55.49 | 2.38 | 1.87 | 15.21 | 55.13 | −4.18 |
| 77.48 | 0.00 | 0.53 | 17.10 | 78.83 | −4.50 |
| 66.93 | 0.49 | 0.85 | 16.43 | 67.97 | −4.15 |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ SO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 46.90 | 1.81 | 1.93 | 9.77 | 45.67 | −5.65 |
| 57.02 | 0.23 | 0.14 | 12.09 | 58.10 | −4.80 |
| 53.99 | 0.56 | 0.36 | 11.37 | 54.71 | −4.96 |
| {Tween 20 (1) + NaH ₂ PO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 43.67 | 5.28 | 3.09 | 15.86 | 41.94 | −3.84 |
| 61.33 | 0.96 | 0.53 | 18.92 | 63.40 | −3.39 |
| 50.63 | 3.46 | 1.32 | 17.46 | 51.26 | −3.52 |
| {Tween 20 (1) + NaCH ₃ COO (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 59.98 | 8.90 | 1.74 | 29.26 | 61.70 | −2.86 |
| 46.47 | 12.74 | 2.67 | 28.00 | 46.38 | −2.87 |
| 74.20 | 3.93 | 0.85 | 31.17 | 78.24 | −2.69 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ CO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 47.72 | 1.25 | 0.021 | 9.84 | 48.47 | −5.56 |
| 43.31 | 1.64 | 0.149 | 8.82 | 43.76 | −6.02 |
| 45.83 | 1.41 | 0.066 | 9.26 | 46.43 | −5.83 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 43.43 | 0.55 | 0.32 | 10.88 | 44.33 | −4.17 |
| 32.25 | 2.80 | 0.75 | 10.13 | 32.34 | −4.30 |
| 45.12 | 0.34 | 0.13 | 11.58 | 46.38 | −4.00 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ S ₂ O ₃ (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 47.72 | 2.67 | 0.56 | 15.34 | 48.84 | −3.72 |
| 31.54 | 6.14 | 1.49 | 14.02 | 31.07 | −3.81 |
| 54.47 | 1.23 | 0.18 | 16.65 | 56.44 | −3.52 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ SO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 31.72 | 2.44 | 0.38 | 10.01 | 32.24 | −4.14 |
| 38.17 | 1.11 | 0.15 | 10.70 | 39.21 | −3.96 |
| 42.84 | 0.39 | 0.07 | 11.25 | 44.13 | −3.94 |
| {Triton X-102 (1) + NaH ₂ PO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 49.01 | 3.19 | 1.16 | 18.04 | 50.10 | −3.22 |
| 36.19 | 5.64 | 3.27 | 15.76 | 34.43 | −3.26 |
| 45.46 | 3.80 | 1.90 | 17.02 | 45.52 | −3.30 |
| {Triton X-102 (1) + NaCH ₃ COO (2) + H ₂ O (3)} | | | | | |
| 28.95 | 13.87 | 0.50 | 23.94 | 30.18 | −2.83 |
| 48.92 | 10.92 | 0.10 | 26.28 | 51.18 | −3.18 |
| 24.73 | 14.56 | 0.88 | 22.99 | 25.29 | −2.83 |

TABLE 5Parameters of Othmer–Tobias equation and correlation factor for {surfactant (1) + salt (2) + H₂O (3)} at $T = 298.15$ K.

| | a | b | R^2 |
|---|--------|--------|--------|
| {Tween 20 (1) + Na ₂ CO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 0.0050 | 2.2384 | 0.9675 |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 0.0225 | 1.8318 | 0.9661 |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ S ₂ O ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 0.0000 | 7.0150 | 0.9584 |
| {Tween 20 (1) + NaSO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 0.0258 | 1.7015 | 0.9999 |
| {Tween 20 (1) + NaH ₂ PO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 0.0052 | 3.3189 | 0.9705 |
| {Tween 20 (1) + NaCH ₃ COO (2) + H ₂ O (3)} | 0.0007 | 7.8011 | 0.9967 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ CO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 0.0428 | 1.4609 | 0.9796 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 0.0006 | 3.6873 | 0.8689 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ S ₂ O ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 0.0004 | 4.7311 | 0.9519 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ SO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 0.0007 | 3.6812 | 0.9990 |
| {Triton X-102 (1) + NaH ₂ PO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 0.0069 | 3.2903 | 0.9664 |
| {Triton X-102 (1) + NaCH ₃ COO (2) + H ₂ O (3)} | 0.0018 | 6.1806 | 0.9894 |

TABLE 6Parameters of Bancroft equation and correlation factor for {surfactant (1) + salt (2) + H₂O (3)} at $T = 298.15$ K.

| | c | d | R^2 |
|---|---------|--------|--------|
| {Tween 20 (1) + Na ₂ CO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 10.6047 | 0.4292 | 0.9631 |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 7.8821 | 0.5138 | 0.9570 |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ S ₂ O ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 5.5996 | 0.1274 | 0.9576 |
| {Tween 20 (1) + Na ₂ SO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 8.5806 | 0.5786 | 0.9999 |
| {Tween 20 (1) + NaH ₂ PO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 4.8501 | 0.2802 | 0.9808 |
| {Tween 20 (1) + NaCH ₃ COO (2) + H ₂ O (3)} | 2.5249 | 0.1169 | 0.9879 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ CO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 8.8057 | 0.6823 | 0.9788 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 7.4633 | 0.2400 | 0.8641 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ S ₂ O ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 5.3016 | 0.1983 | 0.9404 |
| {Triton X-102 (1) + Na ₂ SO ₃ (2) + H ₂ O (3)} | 7.2936 | 0.2813 | 0.9988 |
| {Triton X-102 (1) + NaH ₂ PO ₄ (2) + H ₂ O (3)} | 4.5599 | 0.2605 | 0.9597 |
| {Triton X-102 (1) + NaCH ₃ COO (2) + H ₂ O (3)} | 2.8795 | 0.1478 | 0.9913 |

4. Conclusions

The phase diagrams of Tween 20 and Triton X-102 with Na₂CO₃, Na₂SO₄, Na₂S₂O₃, Na₂SO₃, Na₂HPO₄, NaCH₃COO were determined, since no information on the solubility data of these systems is available at present. It was found that lower amounts of surfactant and salt than that required for polymer or IL-based systems are required to form the two phases, thus reducing the environmental impact. It was demonstrated that both the lipophilic nature of the surfactant and the adequate selection of the phase promoter would render possible the achievement of more effective ATPS. Thus, Na₂CO₃ was the inorganic salt with more salting out capacity, as it could be expected from the Hofmeister series and from the analysis of the molar Gibbs free energy of hydration. The tie-lines were experimentally determined and compared with those obtained by means of the Othmer–Tobias and Bancroft equations, which satisfactorily correlated the experimental results.

Acknowledgement

F.J. Deive wishes to thank Xunta de Galicia for funding through a *Isidro Parga Pondal Program*.

References

- [1] L.A. Ferreira, J.A. Teixeira, J. Chem. Eng. Data 56 (2011) 133–137.
- [2] F.J. Deive, M.A. Rivas, A. Rodríguez, J. Chem. Thermodyn. 43 (2011) 1153–1158.
- [3] R. Jiang, Y.-X. Huang, J.-X. Zhao, C.-C. Huang, Fluid Phase Equilib. 277 (2009) 114–120.
- [4] A. Salabat, S.T. Moghadam, M.R. Far, Calphad-Comput. Coupling Ph. Diagrams Thermochem. 34 (2010) 81–83.
- [5] F.J. Deive, A. Rodríguez, A.B. Pereiro, J.M.M. Araújo, M.A. Longo, M.A.Z. Coelho, J.N. Canongia Lopes, J.M.S.S. Esperança, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, Green Chem. 13 (2011) 390–396.
- [6] Y. Pei, J. Wang, K. Wu, X. Xuan, X. Lu, Sep. Purif. Technol. 64 (2009) 64 288–295.
- [7] Z. Du, Y.L. Yu, J.H. Wang, Chem. Eur. J. 13 (2007) 2130–2137.
- [8] Z. Gu, C.E. Glatz, J. Chromatogr. B 845 (2007) 38–50.
- [9] M.G. Freire, C.M.S.S. Neves, I.M. Marrucho, J.N. Canongia Lopes, L.P.N. Rebelo, J.A.P. Coutinho, Green Chem. 12 (2010) 1715–1718.
- [10] B. Wu, Y. Zhang, H. Wang, J. Phys. Chem. B 112 (2008) 6426–6429.
- [11] Y. Chen, Y. Wang, Q. Cheng, X. Liu, S. Zhang, J. Chem. Thermodyn. 41 (2009) 1056–1059.
- [12] M. Domínguez-Pérez, L.I.N. Tomé, M.G. Freire, I.M. Marrucho, O. Cabeza, J.A.P. Coutinho, Sep. Purif. Technol. 72 (2010) 85–91.
- [13] P.A. Albertsson, Aqueous Polymer-phase Systems, John Wiley and Sons, New York, 1986.
- [14] Y. Zhang, P.S. Cremer, Curr. Opin. Chem. Biol. 10 (2006) 658–663.
- [15] Y. Marcus, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 87 (1991) 2995–2999.
- [16] F.J. Deive, A. Rodríguez, I.M. Marrucho, L.P.N. Rebelo, J. Chem. Thermodyn. 43 (2011) 1565–1572.
- [17] J.P. Martins, J.S.R. Coimbra, F.C. Oliveira, G. Sanaïotti, C.A.S. Silva, L.H.M. Silva, M.C.H. Silva, J. Chem. Eng. Data 55 (2010) 1247–1251.
- [18] J.C. Merchuck, B.A. Andrews, J.A. Asenjo, J. Chromatogr. B 711 (1998) 285–293.
- [19] D.F. Othmer, P.E. Tobias, Ind. Eng. Chem. 34 (1942) 693–696.

JCT-11-390

ANEXO 4

On the double role of surfactants as microalga cell lysis agents and antioxidants extractants

G. Ulloa^{1,2}, C. Coutens¹, M. Sánchez¹, J. Sineiro¹, J. Fábregas³, F. J. Deive^{1,4}, A. Rodríguez^{4*}, M. J. Núñez¹

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 200X, Accepted Xth XXXXXXXXX 200X

⁵ First published on the web Xth XXXXXXXXX 200X

DOI:

A sequential treatment based on the concomitant role of surfactants as cell disrupters and organic media in Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) is investigated in this work, in order to achieve intracellular antioxidant extraction from the microalga *Tetraselmis suecica*. The lytic effect of two common families of surfactants on the the microalga cell walls has been evaluated. The potential salting out capacity of sodium inorganic (carbonate) and organic (citrate and tartrate) salts in aqueous solutions of the selected surfactants was empirically ascertained and discussed in the light of the Hofmeister series. α -tocopherol, β -carotene and gallic acid contained in an aqueous surfactant solution were selected as representative antioxidant biomolecules previously detected in the microalga, and their extraction efficiencies were determined in the most appropriate ATPS. The reliability of the process was tested in real lyophilized microalga cells, obtaining higher antioxidant yields than those achieved through an ultrasound-based conventional method.

Introduction

Globally, there is a growing concern of consumers about the use of antioxidants with synthetic origin. This awareness has triggered an increased research effort devoted to search compounds with antioxidant activity from natural sources, since they naturally occur as secondary metabolites in many vegetable materials¹. In particular, the use of photosynthetic microorganisms, such as microalgae, has been reported to be an adequate source of numerous efficient protective chemicals with anticarcinogenic, anti-inflammatory, antiviral, antimicrobial and cardio and neuro-protective activities, among others²⁻⁴. The blooming commercial potential of the production of natural antioxidants from marine microalgae is reflected in the production of astaxanthin-rich biomass from *Haematococcus*, achieved by Cyanotech and Mera Pharmaceutical and Fuji Health Science, or the production of β -carotene from *Dunaliella* by Cyanotech, Betatene, Western Biotechnology and AquaCarotene^{5, 6}.

One of the bottlenecks faced in this kind of biological processes is placed in the recovery of the desired intracellular metabolites, which makes it necessary to apply cell lysis methods. Some reported treatments are based in physical disruption, such as agitation in the presence of glass and ceramic beads, ultrasonication, high pressure homogenization, cryogenic grinding, while others are based on chemical disruption, such as acid or alkali treatment⁷.

Surface active compounds have been demonstrated to modify the structure of biological membranes. This effect is due to the fact that they can interact with the lipidic bilayer of the cell membranes, even up to a complete solubilization⁸. In this case, two families of readily biodegradable non ionic surfactants - polyoxyethylene (20) sorbitan fatty esters (Tween 20, Tween 40 and Tween 80) and polyoxyethylene t-octylphenols (Triton X-100, Triton X-102 and Triton X-114) - were selected since they are widely applied in

biotechnological processes, food industry, household detergents, cosmetics, pharmaceuticals, oil lubricants, paper production, textile processing, paints and coatings.

The rationale behind this study is based on the concomitant use of these compounds as cell lysis and extraction agents. More specifically, some typical antioxidants are extremely immiscible in aqueous solutions which motivates that most of all the conventional extraction methods require the use of traditional volatile organic solvents. This picture has promoted new efforts devoted to the design of greener extraction technologies such as Aqueous Two-Phase Systems (ATPS). The purpose of these downstream strategies is to maximize product recovery and foster the economic feasibility, due to the avoidance of energy-intensive separation processes. ATPS are considered as efficient and more environmentally friendly extraction processes due to the fact that conventional volatile organic solvents are not used in the whole process and they entail short time and mild operation conditions^{9, 10}.

In this study, *Tetraselmis suecica* was selected as natural source of antioxidants due to it is extensively used in the field of aquaculture, presents high productivity and it is easy to cultivate¹¹. The extraction of its intracellular antioxidant compounds is pursued after having checked the role of different surfactants as cell disrupters through light microscopy analysis. Besides, the addition of sodium-based inorganic and organic salts (sodium carbonate, sodium citrate and sodium tartrate) to surfactant aqueous solutions is carried out in order to investigate their phase forming ability. Thus, the selection of the most appropriate salt is a compromise between the salting out ability, as can also be predicted from the Hofmeister series¹², and its ecotoxicity. Since this last issue is of particular importance and practical significance in this research work, two organic salts, such as citrates and tartrates, have been used as phase promoters. This kind of salts are considered to be more environmentally benign than

inorganic salts, and could be discharged into biological wastewater treatment plants¹³. The most efficient system has been proposed for the separation of α -tocopherol, β -carotene and gallic acid from aqueous solutions, as representative antioxidant biomolecules detected in the microalga *T. suecica*. Finally, the surfactants and salts chosen in terms of cell lysis and ATPS formation, respectively, have been added to real samples of lyophilized cells from *T. suecica*. Their antioxidant potential has been analyzed by means of TBARS assay. On the other hand, the amount of antioxidants extracted have been evaluated by means of UV-spectroscopy and HPLC quantification and compared with the results obtained following a common conventional method.

Results and Discussion

Analysis of *T. suecica* cells disruption

Since the biological effects of surfactants are concentration and structure dependent, Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X-100, Triton X-102 and Triton X-114 were selected as model surface active compounds widely used in biological processes. In order to study the surfactant effect on the microalga cells, several samples at different surfactant concentrations were examined by light microscopy. The results obtained after 2 days under stirring in a shaker at 150 rpm for mixtures containing the microalga cells and the surfactants are qualitatively summarized in Table 1.

TABLE 1

In comparison with the control sample, a higher lytic effect is observed in the *T. suecica* cells treated with the Triton X series regarding to the Tween family. The microalga cells after the time of contact with the former surfactants showed an evident rupture of the cellular matrix and a movement of their antioxidant content into the solvent media could be thus envisaged. A similar finding was also reported for bacterial cells where lipidic membrane was completely solubilized in the presence of a Triton surfactant⁹. It can also be stated that the different concentrations used (0.1, 1, and 5 %) did not cause any drastic effect on the observed cell disruption. A useful parameter usually employed to evaluate the structural properties of a given surfactant is the hydrophilic-lipophilic balance (HLB). This is an empirical number which value varies between 0 and 20. According to the HLB data shown in Table 1, the Triton X series possesses lower HLB values, which could indicate greater interplays between the microalga cells lipidic membrane and more hydrophobic surfactants. Bearing in mind this, the more hydrophobic Triton X-114 stands out as the candidate with higher lytic properties. A higher lytic effect for more hydrophobic compounds was also hypothesized in previous reports tackling with fungi and bacteria^{15, 16}, since they could be more easily incorporated into the polar headgroups of the phospholipid bilayer.

FIGURE 1

The lytic effect can be clearly noticed in Fig. 1, when comparing the lyophilized cells after a treatment with ultrasounds and Triton X-114 (Figs. 1d and 1f) with the initial samples (Figs. 1a, 1c and 1e).

Surfactant-based Aqueous Two-Phase Systems

Up to our knowledge, there is no information related to the application of surfactant-based ATPS as a replacement of the conventional methods using volatile organic compounds. The formation of an upper surfactant and antioxidant-rich phase is pursued, after having found the suitable surfactant rendering an adequate phase splitting.

The vital information provided by the experimental phase diagrams will help us to elucidate the appropriateness of a given salt to act as phase promoter in the presence of the selected surfactant. The binodal curves in mass composition percentage for the ternary mixtures of {surfactant (Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X-100, Triton X-102 or Triton X-114) + salt (sodium carbonate, sodium citrate, sodium tartrate) + H₂O} at 25°C and atmospheric pressure were empirically ascertained. Tween 20 and Triton X-102 were the surface active compounds capable of forming an effective phase segregation in the presence of the selected salts. The results obtained are depicted in Fig. 2, and listed in the ESI. Also, an empirical mathematical model developed by Merchuk *et al.*¹⁷ was used to fit the binodal curve:

Equation 1

where $w_{\text{surfactant}}$ and w_{salt} are the surfactant and salt mass composition percentage, respectively, and A , B and C are the correlation parameters. These values are given in the ESI, together with the standard deviations (σ). On the basis of the deviations results, the abovementioned equation is appropriate to reproduce satisfactorily the binodal curves of the studied systems, as can be observed in Fig. 2.

FIGURE 2

Generally speaking, it is easy to see that carbonate is the anion with higher salting out ability. This anion possesses more hydration capacity, thus decreasing the water quantity available to hydrate the surfactant moiety, as previously reported¹⁸. On the other hand, high concentrations of inorganic salts are not desirable in the effluent streams due to environmental problems. Recently, several authors have used citrate or tartrate as anion, instead of an inorganic one in polymer + salt ATPSs due to its biodegradability and nontoxicity. Thus, the ability of the organic salts studied for phase separation follows the order: citrate > tartrate, in accordance with the sequence predicted by the Hofmeister series. This series initially established the strength of salts, ordering them from water structuring to water destructuring. Hitherto, it has been demonstrated that bulk water structure is not central to the Hofmeister effect, but a complex competition between the salt and the surfactant for the water molecules and the existence of specific interactions between the formers^{19,20}.

In parallel, the information provided by the tie-line length, (*TLL*), and the slope of the Tie Lines (*TLs*), *S*, is a useful tool to ascertain the relative distribution of the surfactant and the inorganic salt between the two aqueous phases in equilibrium. These values are calculated by means of these equations:

Equation 2

Equation 3

where the equilibrium mass fraction of the surfactant (1) and the selected salts (2), in the upper (I) and bottom (II) phases, are represented. The *TL* data obtained for each ternary system and the abovementioned parameters are given in the ESI and are graphically presented in Fig. 3. With the exception of the Tween 20-sodium tartrate system, the surfactant-rich phase present an upper phase mainly composed of surfactant and water. It is clear that concentration of inorganic salts is an important factor affecting the phase equilibrium. The relationship between surfactant concentration and *TLL* indicates that these quantity is enhanced linearly, suggesting that surfactant concentration in the top phase increases with higher concentrations of sodium salts in the bottom phase. The possible reason is that, as the salt concentration augments, the bottom phase becomes increasingly more structured, thus leading to a greater degree of surfactant transfer to the top phase.

FIGURE 3

Antioxidant biomolecules extraction

Model system containing antioxidant biomolecules

The most appropriate surfactant-based ATPS (Tween 20 and Triton X-102 involving sodium carbonate, sodium citrate and sodium tartrate) are now proposed for the separation of three representative model biomolecules detected in the microalga *T. suecica* cells: α -tocopherol, β -carotene, and gallic acid. These compounds were selected as proof of principle to evaluate the ability of the proposed surfactant-based extraction method. This evaluation will be supported by the results expressed as extraction efficiency, *E* (%):

Equation 4

where $m_i^{\text{surfactant}}$ and m_i are the antioxidant mass content in the upper phase and the antioxidant mass content, respectively. The values for extraction yield of α -tocopherol, β -carotene, and gallic acid for each of the ATPS are graphically shown in Fig. 4.

FIGURE 4

The extraction yield for α -tocopherol - higher than 97.7% - is independent on the sodium salt and the surfactant used in agreement with the analysis of variance (ANOVA) ($P = 0.32$ and $P = 0.07$, respectively). The ANOVA results indicate that salt selection plays a crucial role on gallic acid extraction, instead of the surfactant ($P < 0.001$ and $P = 0.66$,

respectively). However, the interaction of both factors were statistically significant ($P < 0.001$), consequently, three different groups (a, b, and c) have been categorized (Figure 4). Note, that the extraction with citrate + Tween 20, citrate + Triton X-102 and tartrate + Triton X-102 showed mean values statistically equals (at $P = 0.07$).

The selected salts, surfactants and their interactions were highly significant according to ANOVA results ($P < 0.001$) for β -carotene extraction. Four different groups (1, 2, 3, and 4) were ranked in ascendant order. The highest mean of β -carotene extraction was obtained when sodium carbonate is used as phase promoters in Triton X - 102 (85.06 ± 2.4 (SD) at $P < 0.05$).

In general, the antioxidant extraction efficiency depends on the hydrophobicity of the bioactive solute in terms of surfactant and salt interactions, as recently reported²¹. Hence, high extraction yields of hydrophobic antioxidants could be appropriately controlled by choosing an accurate extractant agent (inorganic or organic salt). The systems rendering higher values of extraction yield for the three antioxidant biomolecules are those composed of Triton X-102 + sodium tartrate and Tween 20 + sodium citrate. Due to the fact that the latter involves more operational advantages such as a more rapid phase splitting, this system will be selected for further implementation of this method with real samples obtained from cultures of the microalga *T. suecica*.

Real system of the microalga *T. suecica*

The final stage of the work consisted on combining the two previously studied steps in a real sample from the microalga *T. suecica*: surfactant-based microalga cells disruption and antioxidants extraction by means of surfactant-based ATPS. Taking into account the previous results related to the surfactants lytic effect, an aqueous solution of Triton X-114 was selected in order to achieve a release of the desired intracellular antioxidant biomolecules. Additionally, the second step included an ATPS formed by Tween 20 and sodium citrate, as replacement of the more commonly used traditional solvents.

An important factor which is necessary to address is the evaluation of the bioactivity of the extracts obtained with the proposed strategy. This feature is determined by thiobarbituric acid reactive substances method (TBARS), as a standard assay to evaluate the antioxidant potential. Thus, the obtained Tween 20-rich layer turned out to possess an antioxidant activity three times higher than that recorded in the sodium citrate-rich phase (174 vs. 437 $\mu\text{mol/L}$ of MDA). This potential would point out an auspicious use of these extracts with antioxidant purposes.

The presence of different components such as flavonoids, enzymes or vitamins can play a decisive role in the antioxidant activity of microalgae extracts. More specifically, the antioxidant activity of *T. suecica* cells has been reported to be focused mainly on the three previously cited active biomolecules: α -tocopherol, β -carotene and gallic acid²². A case in point is the analysis of the content of these antioxidants in the samples from the surfactant-based ATPS extraction. The antioxidant yields obtained are presented in

Table 2, and are compared with those reached when a traditional ultrasound-based method is used.

TABLE 2

The results revealed that the total content of each bioactive compound is much higher when the strategy using a surfactant as lytic agent instead of the ultrasounds-based method is applied.

In summary, the proposed strategy pairing surfactant as lysis and extractant agents can be adequately implemented for the production of intracellular bioactive compounds from microalgae.

Conclusions

The design of a surfactant-based two-stages strategy comprising a cell disruption stage, and a subsequent ATPS step, was successfully approached in this work to extract antioxidant biomolecules from the microalga *T. suecica*. Among the Tween and Triton X series, Triton X-114 was shown to possess the best lytic effect. Afterwards, the different salting out potential of two model benign organic salts (sodium citrate and tartrate) was empirically compared with that provided by a typical inorganic salt (sodium carbonate) in aqueous solutions of surfactants, and a trend similar to that predicted by Hofmeister was demonstrated. The use of sodium citrate and Tween 20 entailed high values of extraction yield for the three target antioxidant biomolecules in aqueous solutions of surfactants: higher than 99% for α -tocopherol and around 60% for β -carotene and gallic acid. The implementation of this sequential strategy with real samples of *T. suecica* allowed obtaining higher values of all the bioactive molecules than those provide by the traditional ultrasound-based method. As a conclusion, the process proposed marks the onset in the use of more environmentally friendly downstream methods for the extraction of intracellular bioactive compounds from marine microalgae.

Experimental Methods

Chemicals

The non-ionic surfactants Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X-100, Triton X-102 and Triton X-114, the inorganic and organic salts, sodium carbonate, sodium citrate and sodium tartrate, the standards, α -tocopherol, β -carotene, and gallic acid, were purchased from Sigma-Aldrich, and used as received without further purification.

Microalga and culture conditions

Tetraselmis suecica was cultured in a medium which was prepared with sterilized seawater with 3.5% salinity enriched with the following nutrients²³: NaNO_3 , 4 mmolL^{-1} ; NaH_2PO_4 , 0.2 mmolL^{-1} ; ZnCl_2 , 2 μmolL^{-1} ; MnCl_2 , 2 μmolL^{-1} ; Na_2MoO_4 , 2 μmolL^{-1} ; CoCl_3 , 0.2 μmolL^{-1} ; CuSO_4 , 0.2 μmolL^{-1} ; ferric citrate, 40 μmolL^{-1} ; thiamine, 70 μgL^{-1} ; biotin, 20 μgL^{-1} ; vitamin B_{12} , 6 μgL^{-1} ; EDTA, 52.8 μmolL^{-1} . The culture was carried out in 80 L methacrylate prismatic bioreactor (150 x

60 x 10 cm). The bioreactor was inoculated at cell density of $2 \cdot 10^6 \text{ cellmL}^{-1}$ in a semi-continuous operation mode with 40% renewal rate in cyclostat regime with 12 hours light and 12 hours dark periods²⁴ and light intensity of 596 $\mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($5.17 \cdot 10^{-8} \mu\text{mol quanta}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). The temperature was kept at 20°C, and stirring was achieved with airflow. CO_2 was introduced through a diffuser during light period in order to keep the pH in a range of 7 to 8. Culture was kept in a semi-continuous regime for 30 days. The biomass was recovered by centrifugation (2000 x g by 10 min) and freeze at -20°C immediately until lyophilization.

Microalga cell disruption

250 mg of lyophilized microalga were mixed with 8.25 mL of surfactant solutions (Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X-100, Triton X-102 and Triton X-114) at 0.1%, 1%, 5% and 10%. All the mixtures were magnetically stirred for 2 days. For comparison purposes, a traditional disruption method was used, and consisted in sonicating samples containing 250 mg of lyophilized microalga and 8.25 mL of distilled water in 0.5 cycles of 8 min at 60% of the maximum power (dr. Hielscher, Teltow, Germany, model UP200s).

In both cases, initial and final samples were kept for light microscopy analysis, and the images obtained were processed with Image Pro-Plus software.

Extracts preparation

The preparation of the extracts to be used in the aqueous biphasic systems consisted of placing 1g of lyophilized biomass in a glass flask together with 33 ml of an aqueous solution of the selected surfactant at an appropriate concentration. This mixture was stirred for 2 days at room temperature. For comparison purposes, a traditional extraction procedure was also carried out by placing a mixture containing 1g of lyophilized biomass and 33 ml of distilled water in an ultrasound bath (Elmasonic S40H, Germany) for 45 min. The extracts were centrifuged (Sigma laborzentrifugen, Germany) at 360 g for 10 min and the supernatant was collected and filtered through a 0.45 μm , type Millex GN filter (Millipore, USA).

Phase diagrams

The phase diagram of the ternary systems (water + surfactant + salt) at room temperature was determined using a cloud-point titration method²⁵. An amount of an aqueous solution of salt was added to the different surfactant aqueous solutions under constant stirring, until the detection of turbidity. Afterwards, a drop-wise addition of ultra-pure water until a clear monophasic region was carried out. The ternary system compositions were determined by the weight quantification of all components within an uncertainty of $\pm 10^{-4}$ g. The temperature was controlled with a F200 ASL digital thermometer with an uncertainty of ± 0.01 K. The tie-lines (TLs) determination started with the addition of a ternary mixture within the immiscibility region of known mass fraction to the ampoules, the temperature was kept constant and the mixture was stirred vigorously and left to settle for 24 h to ensure a complete separation of the layers.

Partition of antioxidant standards

α -tocopherol, β -carotene, and gallic acid, were mixed with aqueous solutions of the selected surfactants. Sodium carbonate, sodium citrate, and sodium tartrate were added until achieving a desired point of the immiscibility region. The mixture was left to settle for 12 h for complete phase separation. Samples from both the clear surfactant-rich phase and salt-rich phase were simultaneously taken with a syringe from the upper and lower layers, respectively. α -tocopherol, β -carotene, and gallic acid content of the phases were determined by HPLC analysis.

Antioxidant biomolecules analysis

For α -tocopherol analysis, a pretreatment of the extract is required prior to HPLC injection in order to achieve a saponification of the samples and a subsequent α -tocopherol release. An aliquot was taken and mixed with 0.5 mL of 40% (w/v) methanolic solution of KOH. This mixture was stirred for 8 h at room temperature, and filter through a 0.45 μ m membrane. The resulting solution was mixed with 7 mL of hexane, left to settle in a decanter and the organic phase was dried under nitrogen. The residue was re-dissolved in 0.5 mL of methanol. This solution (50 μ L) with adequate concentration was injected into a HPLC equipped with a UV-Vis detector (JASCO UV-1575) and a Kromasil 100 C₁₈ (25x0.4 cm, 5 μ m particle size) column (Teknokroma, Barcelona, Spain). It was operated at 30°C in isocratic mode at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was methanol:acetonitrile (30:70 v/v). The identification and quantification were made by comparing the retention time of the standard of α -tocopherol with a range curve from 3 - 120 μ g/mL at 205 nm²⁶.

β -carotene determination was performed as reported elsewhere²⁷. Briefly, the absorbance of an appropriate dilution of the samples was measured at 480 nm in a Jasco V-530 spectrophotometer, using the corresponding dilution of the selected surfactant as blank.

Gallic acid quantification was determined by Folin-Ciocalteu method²⁸. Briefly, 0.5 mL of extract was added 2.5 mL of Folin-Ciocalteu diluted 1:10 with water and 2 mL of 7.5% solution of Na₂CO₃. After incubation at 40°C for 20 min, the absorbance was measured at 760 nm in a Jasco V-530 UV-visible spectrophotometer in a range comprised between 0 and 100 ppm.

Antioxidant activity assay

Antioxidant activity of the obtained extracts was evaluated by the thiobarbituric acid reactive substances method (TBARS). Liposomes were prepared as described elsewhere²⁹. Briefly, 0.1 g of phosphatidylcholine (α -lecithin) was emulsified with 10 mL of 3.4 mM phosphate buffer (pH 7.4) using a sonicator UP200s (cycle 0.5 and amplitude 60%) (dr. Hielscher, Teltow, Germany), this reagent being always freshly prepared. 1 mL of lecithin was used for assays, whereas 1 mL of phosphate buffer for blank-reactive. Mixture solution of trichloroacetic acid, thiobarbituric acid and hydrochloric acid (TCA-TBA-HCl) was prepared (15%-0.375%-0.25N)

according to relevant literature³⁰.

Volumes of 100 μ L either sample (extracts) or distillate water (blank-sample) was added. Peroxidation was initiated by adding 100 μ L of 100 mM ferric chloride³¹. 2 mL of TCA-TBA-HCl mixture were also added. The reaction was run at 50°C for 24 h (samples and calibration curve). Later, the samples were cooled and filtrated through of Millipore cartridges of 0.45 μ m to measure the absorbance at 535 nm on a Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer. A calibration curve 10-500 μ M MDA was done to express the results as MDA equivalents.

Statistical analysis

All the measurements were performed in triplicate and the data are presented as mean \pm standard deviation (SD) values. Additionally, the biomolecules extraction (α -tocopherol, β -carotene and gallic acid) through surfactant-based ATPS was analyzed by two-way ANOVA. One-way ANOVA was applied to found different mean values of antioxidant yields extracted by ultrasound-based method and the novelty surfactant-based ATPS. Statistical software SPSS ver.15 was used.

Acknowledgements

F. J. Deive wants to thank Xunta de Galicia for a Isidro Parga Pondal contract.

References

- 1 A. Moure, J. M. Cruz, D. Franco, J. M. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez, M. J. Núñez, J. C. Parajó, *Food Chem.* 2001, **72**, 145-171.
- 2 W. Y. Huang, Y. Z. Cai, Y. B. Zhang, *Nutr. Cancer* 2010, **62**, 1-20.
- 3 G. K. Jayaprakasha, K. K. Mandadi, S. M. Poulouse, Y. Jadegoud, G. A. N. Gowda, B. S. Patil, *Bioorg. Med. Chem.* 2007, **15**, 4923-4932.
- 4 G. K. Jayaprakasha, Y. Jadegoud, G. A. N. Gowda, B. S. Patil, *J. Agric. Food Chem.* 2010, **58**, 180-186.
- 5 M. Olaizola, *Biomol Eng.* 2003, **20**, 459-466.
- 6 A. J. del Campo, M. García-González, M. G. Guerrero, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, **74**, 1163-1174.
- 7 E. Molina Grima, E. H. Belarbia, F. G. Acien-Fernández, A. Robles-Medina, Y. Chisti, *Biotechnol. Adv.* 2003, **20**, 491-515.
- 8 F. J. Deive, E. Carvalho, L. Pastrana, M. L. Rúa, M. A. Longo, M. A. Sanromán, *Bioresour. Technol.* 2009, **100**, 3630-3637.
- 9 J. P. Martins, J. S. dos Reis Coimbra, F. C. Oliveira, G. Sanaiotti, C. A. S. da Silva, L. H. Mendes da Silva, M. C. H. da Silva, *J. Chem. Eng. Data* 2010, **55**, 1247-1251.
- 10 Y. Pei, J. Wang, K. Wua, X. Xuana, X. Lu, *Sep. Purif. Technol.* 2009, **64**, 288-295.
- 11 L. Rodolfi, Z. G. Chini, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M. Tredici, *Biotechnol. Bioeng.* 2009, **102**, 100-112.
- 12 F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1988, **24**, 247-260.
- 13 M. T. Zafarani-Moattar, S. Hamzehzadeh, *J. Chem. Eng. Data* 2010, **55**, 1598-1610.
- 14 D. H. Lee, E. S. Kim, H. W. Chang, *Geosci. J.* 2005, **9**, 261-267.
- 15 R. J. Bernot, E. E. Kennedy, G. A. Lamberti, *Environ. Toxicol. Chem.* 2005, **24**, 1759-1765.
- 16 F. J. Deive, A. Rodríguez, A. Varela, C. Rodrigues, M. C. Leitão, J. A. M. P. Houbraken, A. B. Pereiro, M. A. Longo, M.

A. Sanromán, R. A. Samson, L. P. N. Rebelo, C. S. Pereira, *Green Chem.* 2011, **13**, 687-696.

17 J.C. Merchuck, B.A. Andrews, J.A. Asenjo, *J. Chromatogr. B* 1998, **711**, 285-293.

18 G. Ulloa, C. Coutens, M. Sánchez, J. Sineiro, A. Rodríguez, F. J. Deive, M. J. Núñez, *J. Chem. Thermodyn.* 2011, In Press.

19 X. Xie, Y. Yan, J. Han, Y. Wang, G. Yin, W. Guan, *J. Chem. Eng. Data* 2010, **55**, 2857-2861.

20 J. Han, C. Yu, Y. Wang, X. Xie, Y. Yan, G. Yin, W. Guan, *Fluid Phase Equilib.* 2010, **295**, 98-103.

21 M. G. Freire, C. L. S. Louros, L. P. N. Rebelo, J. A. P. Coutinho, *Green Chem.* 13, 2011, 1536-1545

22 G. Ulloa, M. Sánchez, J. Sineiro, J. Fábregas, M. J. Núñez, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2011. Submitted for publication.

23 J. Fábregas, C. Herrero, B. Cabezas, J. Abalde, *Aquaculture* 1985, **49**, 231-244.

24 A. Otero, J. Fábregas, *Aquaculture* 1997, **159**, 111-123.

25 P. A. Albertsson, *Aqueous polymer-phase systems*, John Wiley and Sons, 1986.

26 D. I. Sánchez-Machado, J. López-Hernández, P. Paseiro-Losada, *J. Chromatogr. A* 2002, **976**, 277-284.

27 S. W. Jeffrey, G. F. Humphrey, *Biochem. Physiol. Pflanz* 1975, **167**, 191-194.

28 V. L. Singleton, J. A. Rossi, *Am. J. Enol. Vitic.* 1965, **16**, 144-158.

29 Y. Miyake, K. Yamamoto, Y. Morimitsu, T. Osawa, *J. Agric. Food Chem.* 1997, **45**, 4619-4623.

30 J. A. Buege, S. D. Aust, *Methods Enzymol.* 1978, **52**, 302-310.

31 O. I. Aruoma, A. Murcia, J. Butler, B. Halliwell, *J. Agric. Food Chem.* 1993, **41**, 1880-1885.

Notes

¹ Department of Chemical Engineering, University of Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain

² Instituto Tecnológico de Sonora, 85130. Ciudad Obregón, Sonora.

³ México

³ Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain

⁴ Department of Chemical Engineering, University of Vigo, 36310, Vigo, Spain

Fig. 1a

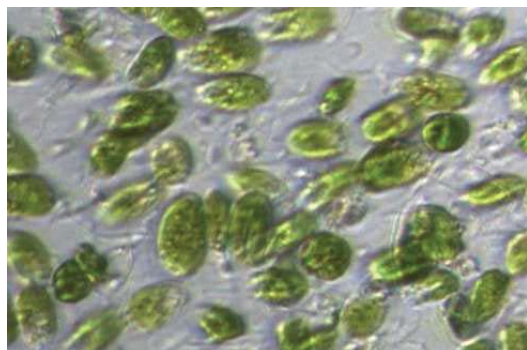


Fig. 1b

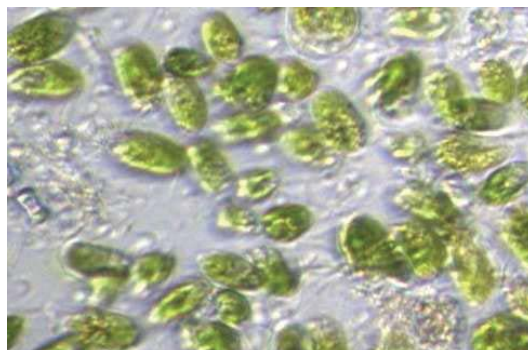


Fig. 1c

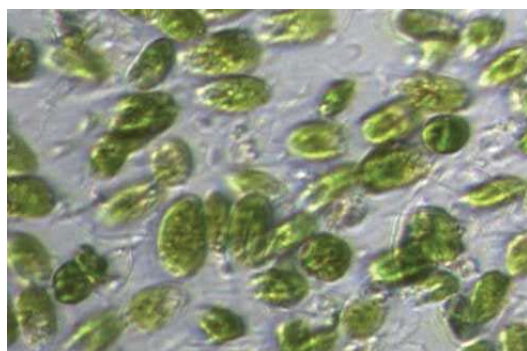


Fig. 1d

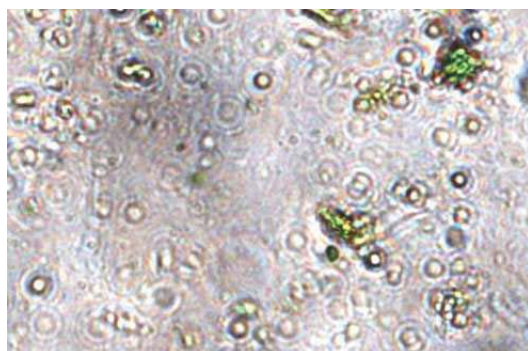


Fig. 1e



Fig. 1f



Fig. 1 Light Microscopy analysis of *T. suecica* cells at different conditions: a) Initial sample in water; b) In water with magnetic stirring after 2 days; c) Initial sample in water ; d) In water under sonication after 8 min; e) Initial sample in Triton-X114; d) In Triton-X114 after 2 days

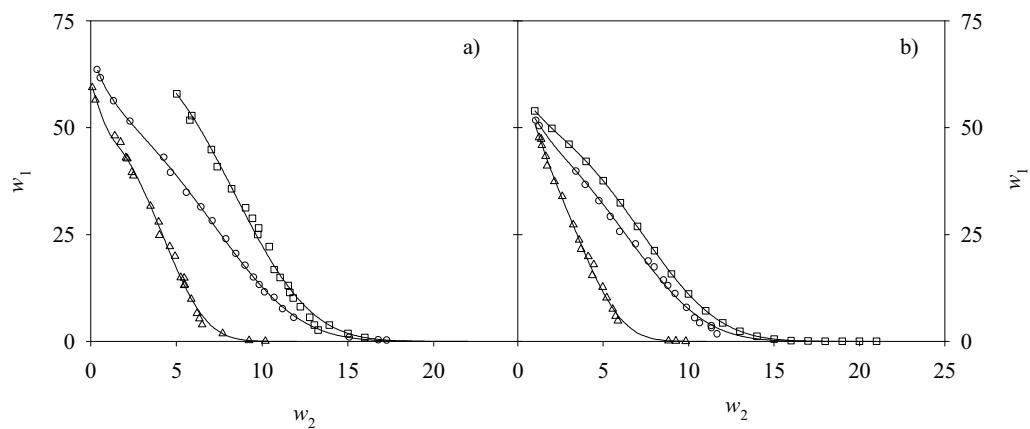


Fig. 2 Experimental and correlated phase diagrams of a) {Tween 20 (1) + salt (2) + H₂O (3)} and b) {Triton X-102 (1) + salt (2) + H₂O (3)} at $T = 298.15$ K: \triangle , Sodium carbonate; \circ , Sodium citrate; \square , Sodium tartrate.

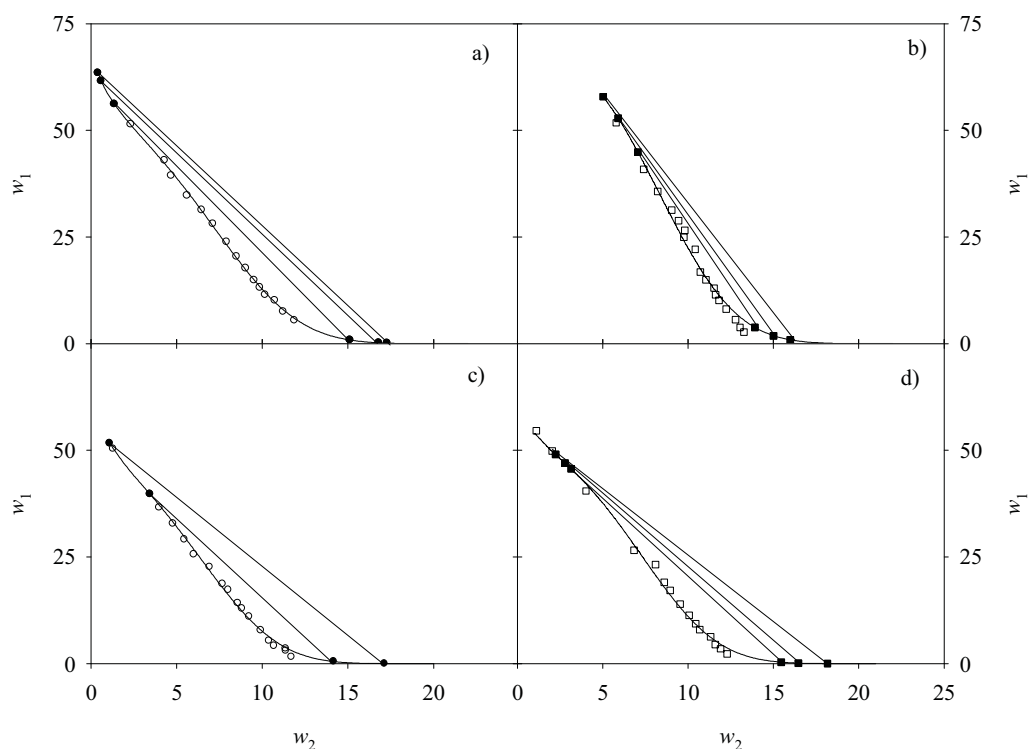


Fig. 3 Experimental and correlated phase diagram and experimental tie-lines of a) and b) {Tween 20 (1) + Salt (2) + H₂O (3)}, and c) and d) {Triton X-102 (1) + salt (2) + H₂O (3)} at $T = 298.15$ K: \circ , Sodium citrate; \square , Sodium tartrate. Void symbols represent experimental phase diagram, and full symbols represent tie-line data

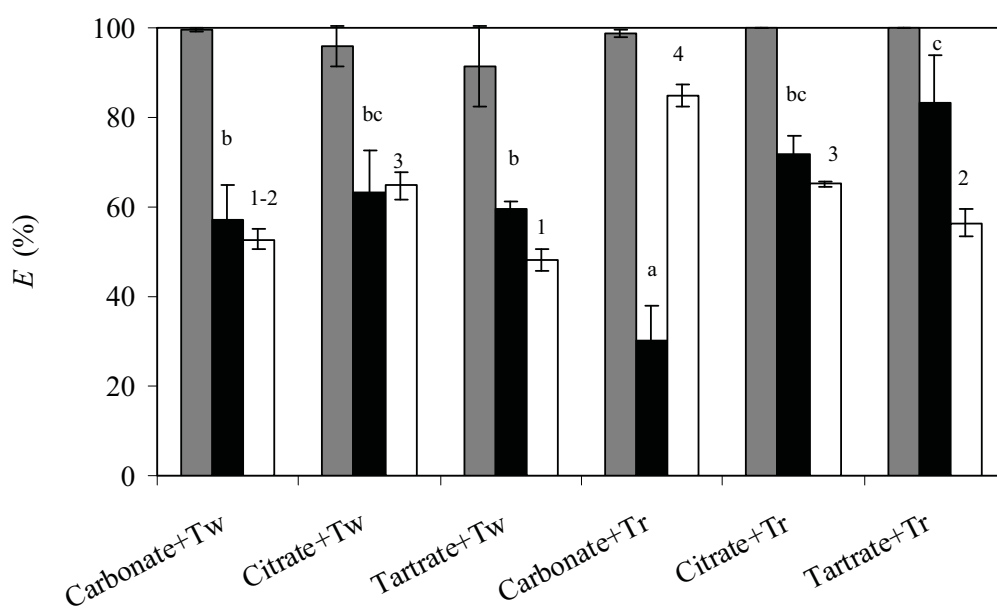


Fig. 4 Antioxidant extraction capacity of the selected surfactant-based ATPS. Grey bars: α -tocopherol; Black bars: Gallic acid; White bars: β -carotene. (a, b, c) refer to different mean values at $P < 0.05$, $n=3$. (1, 2, 3, 4) refer to different mean values at $P < 0.05$, $n=3$.

Table 1 Cell lysis effect of surfactants in biomass from *Tetraselmis suecica* after 2 days of contact

| Surfactant | HLB | Concentration (% w/w) | Lytic effect |
|---------------------------|------|--------------------------|--------------|
| Triton X-114 ^a | 12.3 | 0.1 | ++ |
| | | 1 | +++ |
| | | 5 | +++ |
| Triton X-102 ^a | 14.4 | 0.1 | 0 |
| | | 1 | 0 |
| | | 5 | 0 |
| Triton X-100 ^a | 13.4 | 0.1 | 0 |
| | | 1 | + |
| | | 5 | + |
| Tween 20 ^b | 16.7 | 0.1 | 0 |
| | | 1 | 0 |
| | | 5 | 0 |
| Tween 40 ^b | 14.9 | 0.1 | 0 |
| | | 1 | 0 |
| | | 5 | + |
| Tween 80 ^{b *} | 15.0 | 0.1 | + |
| | | 1 | 0 |
| | | 5 | 0 |

+++ strong positive, ++ positive, + little, 0 no effect

* Immediate lytic effect.

^a Data from Ref. 14^b Data from the supplier

Table 2 Comparison of antioxidant extraction treatments in cells of microalga *Tetraselmis suecica*

| Lysis | Gallic Acid (mg biomolecule / g dry biomass) | Antioxidant yield | |
|-------------|--|---|--|
| | | α -tocopherol (μ g biomolecule / g dry biomass) | β -carotene (mg biomolecule / g dry biomass) |
| Ultrasound | 3.2 ± 0.2 | 47.3 ± 1.4 | 0.04 ± 0.01 |
| Triton-X114 | 5.1 ± 0.1 | 174.6 ± 31.0 | 1.3 ± 0.1 |

EQUATIONS

$$\text{Eq 1: } w_{\text{surfactant}} = A \exp \left(w_{\text{salt}}^{0.5} - w_{\text{salt}}^3 \right)$$

$$\text{Eq 2: } TLL = \left[\left(w_1^I - w_1^{II} \right)^2 + \left(w_2^I - w_2^{II} \right)^2 \right]^{0.5}$$

$$\text{Eq 3: } S = \frac{w_1^I - w_1^{II}}{w_2^I - w_2^{II}}$$

$$\text{Eq 4: } E(\%) = \left(\frac{m_i^{\text{surfactant}}}{m_i} \right) \cdot 100$$

On the double role of surfactants as microalga cell lysis agents and antioxidants extractants

G. Ulloa^{1,2}, C. Coutens¹, M. Sánchez¹, J. Sineiro¹, J. Fábregas³, F. J. Deive^{1,4}, A.

Rodríguez^{4*}, M. J. Núñez¹

¹Department of Chemical Engineering, University of Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain

²Instituto Tecnológico de Sonora, 85130. Ciudad Obregón, Sonora. México

³Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain

⁴Department of Chemical Engineering, University of Vigo, 36310, Vigo, Spain

Electronic Supplementary Information

Table 1 Binodal data for {Tween 20 (1) + salt (2) + H₂O (3)} two-phase systems at room temperature as a function of mass percentage of the components.

| 100 w_2 | 100 w_1 | 100 w_2 | 100 w_1 |
|----------------|-----------|-----------------|-----------|
| Sodium citrate | | Sodium tartrate | |
| 0.41 | 63.47 | 5.03 | 57.91 |
| 0.60 | 61.54 | 5.90 | 52.84 |
| 1.36 | 56.17 | 5.78 | 51.76 |
| 2.33 | 51.39 | 7.05 | 44.92 |
| 4.30 | 42.95 | 7.39 | 40.89 |
| 4.69 | 39.40 | 8.22 | 35.70 |
| 5.62 | 34.72 | 9.04 | 31.28 |
| 6.46 | 31.33 | 9.44 | 28.83 |
| 7.12 | 28.09 | 9.80 | 26.55 |
| 7.92 | 23.85 | 9.75 | 24.98 |
| 8.50 | 20.42 | 10.42 | 22.15 |
| 9.03 | 17.68 | 10.71 | 16.82 |
| 9.52 | 14.88 | 11.05 | 14.97 |
| 9.86 | 13.15 | 11.52 | 13.02 |
| 10.17 | 11.44 | 11.61 | 11.47 |
| 10.73 | 10.13 | 11.81 | 10.13 |
| 11.22 | 7.51 | 12.23 | 8.07 |
| 11.88 | 5.46 | 12.77 | 5.61 |
| 15.12 | 0.85 | 13.04 | 3.78 |
| 16.80 | 0.21 | 13.27 | 2.67 |
| 17.29 | 0.14 | 13.92 | 3.78 |
| | | 15.01 | 1.85 |
| | | 15.99 | 0.89 |

Table 2 Binodal data for {Triton X-102 (1) + salt (2) + H₂O (3)} two-phase systems at room temperature as a function of mass percentage of the components.

| 100 w_2 | 100 w_1 | 100 w_2 | 100 w_1 |
|----------------|-----------|-----------------|-----------|
| Sodium citrate | | Sodium tartrate | |
| 1.09 | 51.60 | 1.11 | 54.54 |
| 1.29 | 50.32 | 2.03 | 49.84 |
| 3.44 | 39.71 | 2.23 | 48.99 |
| 3.99 | 36.56 | 2.78 | 46.97 |
| 4.79 | 32.80 | 3.14 | 45.62 |
| 5.45 | 29.08 | 4.01 | 40.45 |
| 6.00 | 25.58 | 6.84 | 26.59 |
| 6.93 | 22.66 | 8.08 | 23.20 |
| 7.68 | 18.65 | 8.60 | 19.07 |
| 8.02 | 17.26 | 8.95 | 17.13 |
| 8.57 | 14.20 | 9.53 | 13.96 |
| 8.82 | 12.93 | 10.07 | 11.35 |
| 9.24 | 11.02 | 10.44 | 9.38 |
| 9.92 | 7.81 | 10.68 | 7.98 |
| 10.39 | 5.36 | 11.31 | 6.29 |
| 10.68 | 4.18 | 11.60 | 4.53 |
| 11.37 | 3.53 | 11.91 | 3.51 |
| 11.38 | 3.04 | 12.29 | 2.32 |
| 11.70 | 1.59 | 15.46 | 0.36 |
| | | 16.47 | 0.14 |
| | | 18.17 | 0.02 |

Table 3 Fitting parameters of Merchuck equation and standard deviation

| | <i>A</i> | <i>B</i> | <i>C</i> ·10 ⁻³ | <i>σ</i> |
|--|----------|----------|----------------------------|----------|
| Tween 20 (1)+ Sodium citrate (2) + H ₂ O (3) | 73.38 | -0.2268 | 1.03 | 0.451 |
| Tween 20 (1)+ Sodium tartrate (2) + H ₂ O (3) | 101.69 | -0.1937 | 0.90 | 1.456 |
| Triton X-102 (1)+ Sodium citrate (2) + H ₂ O (3) | 67.28 | -0.2553 | 1.37 | 0.791 |
| Triton X-102 (1)+ Sodium tartrate (2) + H ₂ O (3) | 66.06 | -0.1900 | 1.16 | 0.972 |

Table 4 Experimental tie-lines in mass percentage for {Surfactant (1) + salt (2) + H₂O (3)} at room temperature and antioxidant extraction

| Surfactant-rich phase | | Inorganic salt-rich phase | | TLL | S |
|---|---------|---------------------------|------------|-------|-------|
| w_1^I | w_2^I | w_1^{II} | w_2^{II} | | |
| Tween 20 (1) + Sodium Citrate (2) + H ₂ O (3) | | | | | |
| 63.47 | 0.41 | 0.14 | 17.29 | 65.54 | -3.75 |
| 56.17 | 1.36 | 0.85 | 15.12 | 57.01 | -4.02 |
| 61.54 | 0.60 | 0.21 | 16.80 | 63.43 | -3.78 |
| Tween 20 (1) + Sodium Tartrate (2) + H ₂ O (3) | | | | | |
| 57.91 | 5.03 | 0.89 | 15.99 | 58.06 | -5.20 |
| 44.92 | 7.05 | 3.78 | 13.92 | 41.71 | -5.99 |
| 52.84 | 5.90 | 1.85 | 15.01 | 51.80 | -5.60 |
| Tween 20 (1) + Sodium Carbonate + H ₂ O (3)* | | | | | |
| 56.50 | 0.28 | 0.206 | 9.24 | 57.00 | -6.28 |
| 59.41 | 0.10 | 0.035 | 10.19 | 60.23 | -5.88 |
| 42.74 | 2.14 | 1.815 | 7.70 | 41.30 | -7.36 |
| Triton X-102 (1) + Sodium Citrate (2) + H ₂ O (3) | | | | | |
| 51.60 | 1.09 | 0.02 | 17.13 | 54.02 | -3.21 |
| 39.71 | 3.44 | 0.51 | 14.17 | 40.64 | -3.65 |
| 50.32 | 1.29 | 0.29 | 14.78 | 51.81 | -3.71 |
| Triton X-102 (1) + Sodium Tartrate (2) + H ₂ O (3) | | | | | |
| 48.99 | 2.23 | 0.02 | 18.17 | 51.50 | -3.07 |
| 45.62 | 3.14 | 0.36 | 15.46 | 46.90 | -3.67 |
| 46.97 | 2.78 | 0.14 | 16.47 | 48.79 | -3.42 |
| Triton X-102 (1) + Sodium Carbonate + H ₂ O (3)* | | | | | |
| 47.72 | 1.25 | 0.021 | 9.84 | 48.47 | -5.56 |
| 43.31 | 1.64 | 0.149 | 8.82 | 43.76 | -6.02 |
| 45.83 | 1.41 | 0.066 | 9.26 | 46.43 | -5.83 |

*Data from Ref. 18